

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
MENTION " PHARMACIE "

PAR

Jean METZINGER

PHARMACIEN

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

EX-PRÉPARATEUR DE CHIMIE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

né le 8 Août 1928 à METZERVISSE (Moselle)

Études sur les Sulfamides et sur la Sulfamidorésistance

Travail du Laboratoire de Chimie

Soutenue le 30 AVRIL 1954, devant la Commission d'Examen

Président

MM. KAYSER

Juges

MARCHAL

M^{lle} BESSON

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
MENTION " PHARMACIE "

PAR

Jean METZINGER

PHARMACIEN

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

EX-PRÉPARATEUR DE CHIMIE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

né le 8 Août 1928 à METZERVISSE (Moselle)

Études sur les Sulfamides et sur la Sulfamidorésistance

Travail du Laboratoire de Chimie

Soutenue le 30 AVRIL 1954, devant la Commission d'Examen

Président

MM. KAYSER

Juges

MARCHAL

M^{lle} BESSON



UNIVERSITÉ DE NANCY -:- FACULTÉ DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN.....Professeur G.RICHARD

ASSESSEUR.....Professeur A.MEUNIER

PROFESSEURS: MM.

N.....	Toxicologie et analyse chimique
MEUNIER A.	Pharmacie galénique
FRANCOIS (Mlle M.-Th.)	Matière médicale
KAYSER F.	Chimie
RICHARD G.	Pharmacie chimique
FRANQUET R.	Botanique
MARCHAL J.G.	Microbiologie
STEIMETZ E.	Sciences Naturelles

MAITRES DE CONFÉRENCES: MM.

BLOCH J.M.	Sciences Physiques
SOLEIL J.	Sciences Physiques

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES: MM.

MEUNIER A.	Hydrologie
FRANCOIS (Mlle M.-Th.)	Hygiène
KAYSER F.	Chimie biologique
RICHARD G.	Chimie organique
FRANQUET R.	Cryptogamie
MARCHAL J.G.	Parasitologie
ROBLOT R. Professeur	Fac.de Droit - Déontologie
STEIMETZ E.	Mycologie - Minéralogie
SOLEIL	Chimie analytique
BERNANCOSE A.	Physique
BESSION (Mlle)	Pharmacodynamie

CHEFS DE TRAVAUX: MM.

LASSEUR (Mme A.)	Microbiologie - Parasitologie
BESSION (Mlle S.)	Chimie biologique
ANZIANI P.	Chimie
MIRJOLET M.	Sciences Pharmaceutiques
BERNANOSE A.	Physique

CHARGÉS DE TRAVAUX: MM.

PIERFITTE M.	Physique
BENÉ R.	Micrographie

PROFESSEUR HONORAIRE: M.CORDEBARD H.

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE: M.VERNIER

SECRÉTAIRE: P.RADUREAU

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver, ni les imputer.

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MA FEMME

A MON PERE

ET

A TOUS LES MIENS.

A notre Maître et Président de Thèse
MONSIEUR LE DOYEN F.KAYSER
Professeur de Chimie

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MARCHAL
Professeur de Microbiologie

A MADEMOISELLE S.BESSON
Docteur ès-Sciences
Chef de Travaux Pratiques de Chimie Biologique
Chargée du Cours de Pharmacodynamie

qui ont bien voulu juger notre thèse
Témoignage de gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555804_0007

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

en témoignage de notre reconnaissance.

AVANT - PROPOS

=====

Depuis le début de mes études je désirais m'initier à la recherche scientifique; c'est à la fin de ma seconde année que j'ai pu réaliser ce projet, grâce à M.le Doyen F.KAYSER qui m'a accepté comme Moniteur au Laboratoire de Chimie, malgré le peu de temps dont je disposais alors.

M.le Doyen KAYSER m'a proposé de poursuivre les travaux commencés par mes prédécesseurs sur les sulfamides et sur les associations à base de sulfamides. C'est lui qui m'a guidé et m'a apporté, tout au long de ces recherches, le secours de sa grande expérience et de sa haute compétence, qu'il reçoive ici l'assurance de toute ma gratitude.

Si j'ai pu, dans ce travail, utiliser quelques techniques microbiologiques, je le dois à l'enseignement du Professeur J-G.MARCHAL et de ses collaborateurs, en particulier de Mme POUTEAU-THOUVENOT; je les assure ici de mes sentiments reconnaissants.

Mlle S.BESSON, Chef de Travaux de Chimie biologique, m'a toujours réservé le meilleur accueil dans son Laboratoire et ses conseils m'ont été particulièrement précieux. Elle a accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que M.le Professeur MARCHAL. A tous deux, j'adresse de vifs et sincères remerciements.

Avant de passer à l'exposé de mon travail, je m'en voudrais de ne pas adresser une pensée de gratitude à tous ceux qui m'ont aidé à le mener à bien, en particulier à M.le Professeur J-M.BLOCH, à M.MIRJOLET, Chef de Travaux, et à tous mes camarades du Laboratoire de Chimie.

INTRODUCTION

La magnifique découverte de l'action thérapeutique des sulfamides, date de moins de 20 ans; c'est en effet en 1935 que TREFOUEL, Mme TREFOUEL, NIEMI et BOVET publiaient que l'action du Prontosil, breveté 3 ans plus tôt par MIETZSCH et KLARER et expérimenté par BOVET, n'était pas due à ce corps lui-même, mais à son produit de décomposition dans l'organisme: la sulfanilamide.

Après un engouement sans précédent, la vogue des sulfamides a fortement diminué; cela s'explique, non seulement par la découverte d'antibiotiques bactériostatiques puissants, mais aussi par les insuffisances que présente la sulfamidothérapie: apparition de troubles rénaux et sanguins graves, réapparition de microbes sulfamidorésistants.

Or, depuis quelques années, la sulfamidothérapie a regagné beaucoup le terrain, cela est peut-être moins sensible en France que dans d'autres pays; si on en croit les statistiques américaines, la vente des sulfamides a doublé de 1948 à 1951 et, en 1952, elle était quatre fois plus forte qu'en 1936.

A quoi est dû ce regain de faveur? D'une part aux découvertes que les antibiotiques d'origine naturelle ont engendrées: apparition de microbes résistants comme dans le cas des sulfamides, tétracyclines qui ont provoqué d'assez nombreux accidents mortels. D'autre part, la sulfamidothérapie s'est améliorée; l'emploi des mélanges polysulfamidiques a permis de réduire les doses nécessaires et donc la toxicité, l'association sulfamidopénicilline est souvent très avantageuse. Mais, surtout, des sulfamides nouvelles ont été lancées sur le marché, moins toxiques et plus solubles, donc beaucoup mieux tolérées, tels sont la 6-sulfanilamide-2,4-diméthyl pyrimidi-

dine (Elcosine Ciba) et le 3,4-diméthyl-5-sulfanilamido-isoxazol (Gantrisine Roche).

La sulfamidothérapie restant d'actualité, les problèmes que posent les sulfamides demeurent aussi parmi les préoccupations majeures des biochimistes:

1°) La recherche de sulfamides nouvelles offre encore des possibilités et c'est dans ce sens que nous avons préparé et décrit un dérivé mercuriel de la sulfanilamide qu'on trouvait déjà mentionné dans la bibliographie, mais dont les propriétés n'étaient pas indiquées et la préparation laborieuse.

2°) Les associations nouvelles à base de sulfamides, outre l'intérêt thérapeutique qu'elles pourraient éventuellement présenter, peuvent apporter des éclaircissements sur le mode d'action des sulfamides, car la compétition sulfamide acide paraminobenzoïque n'explique qu'imparfaitement les effets des sulfamides.

Nous avons ainsi poursuivi des recherches que nos prédécesseurs, dans le Laboratoire de Chimie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, avaient déjà commencées. Nous avons cherché à préciser l'action présentée par des associations de sulfamides avec certains phénols et quino-nes ou avec des antiseptiques et inhibiteurs d'enzymes, de même qu'avec des corps susceptibles de jouir de propriétés antisulfamides.

3°) La sulfamidorésistance est un phénomène encore bien mystérieux; une synthèse accrue d'antisulfamides n'ayant pas toujours pu être mise en évidence, le champ des recherches reste ouvert; nous nous sommes demandé si la bactérie devenue sulfamidorésistante n'avait pas accru son pouvoir de détoxiquer la sulfanilamide; de même que l'homme acétyle la sulfanilamide, Esch.coli qui possède aussi du coenzyme A et un système acétylant, ne pourrait-il pas inactiver la sulfanilamide en l'acétylant? C'est pourquoi nous avons été amené à pratiquer systématique-

ment le délicat dosage du coenzyme A chez Esch.coli sulfamidorésistant et dans la souche dont il dérive.

Nous exposerons donc l'ensemble de nos recherches d'après le plan suivant:

Chapitre I: Généralités sur les techniques employées dans nos recherches.

Chapitre II: Préparation et pharmacologie d'un dérivé mercuriel de la sulfanilamide.

Chapitre III: Etude d'associations à base de sulfamides.

A - Association à des agents susceptibles de former des systèmes oxydoréducteurs (hydroquinone, quinone, vitamine K).

B - Analyse des modalités de la synergie sulfamide-salicylate
1) sur Esch.coli non proliférant,
2) sur le tissu hépatique,
3) effet de l'addition de pantothénate.

C - Association avec des antiseptiques et des inhibiteurs d'enzymes:

- 1) 2-4 dinitrophénol
- 2) acide malonique
- 3) agents chélatants: "oxine",
"complexon III"
- 4) acide borique.

D - Association avec des corps susceptibles d'agir comme antisulfamide:

- 1) acide p aminohippurique
- 2) rutine
- 3) glutamine, acide glutamique, asparagine.

Chapitre IV: Essai d'interprétation de la sulfamido-résistance d'après les teneurs en coenzyme A.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS

SUR LES TECHNIQUES SUIVIES DANS NOS RECHERCHES

Nous nous limiterons dans ce chapitre à l'exposé des techniques que nous avons suivies dans l'étude de l'activité antibiotique des associations à base de sulfamides et dans l'emploi de l'appareil manométrique de Warburg.

Le mode opératoire de dosage du coenzyme A a été inclus dans le chapitre IV consacré à l'étude de la sulfamidorésistance.

A - MICRO-ORGANISME ET MILIEU DE CULTURE UTILISÉS.-

A la suite de nos prédécesseurs au laboratoire de Chimie, nous avons utilisé, dans nos essais in vitro, *Escherichia coli* (Colibacille)⁽¹⁾, bactérie ne prenant pas le Gram, dont la culture est aisée et se prête facilement à des mesures opacimétriques: elle ne forme pas de voile et se développe dans la totalité du milieu de culture.

Le colibacille étant peu pathogène pour la souris, il ne nous a pas été possible de l'employer comme agent infectant lorsque nous transposions nos essais in vivo. Notre choix a porté alors sur *Salmonella typhi murium*⁽¹⁾. Cette bactérie, également à réaction Gram négative, présente l'avantage d'être très pathogène pour la souris et très peu pathogène pour l'homme; elle se développe bien dans le milieu synthétique que nous utilisons.

(1) Ces souches ont été aimablement mises à la disposition du Laboratoire de Chimie par M. le Professeur MARCHAL, que nous assurons à nouveau de notre gratitude.

Pour nos cultures, nous avons employé le milieu synthétique de Tulasne et Wurtz dans lequel, comme nos prédécesseurs et pour les mêmes raisons, nous avons remplacé l'urée par le sulfate d'ammonium. Nous nous sommes de plus astreint à ajouter une quantité fixe et exactement connue de phosphates (la concentration de ce sel influençant beaucoup le développement bactérien 75). La composition de ce milieu est la suivante:

PO_4KH_2	1	g
CLK	0,50	g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,50	g
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	4,73	g
$\text{PO}_4\text{Na}_2, 12 \text{ H}_2\text{O}$	25	g
glucose	10	g
eau distillée, q.s.p.	1000	ml.

Les sels minéraux sont dissous dans 900 ml. d'eau distillée. Cette solution est stérilisée à l'autoclave à 110° pendant 10 minutes. On ajoute alors le glucose et, après refroidissement, on ajuste le pH à 7,2 (en général cette valeur du pH est obtenue d'emblée en opérant dans les conditions indiquées), on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée et on filtre. Après stérilisation de 25 minutes à 105° , le milieu est prêt à l'emploi.

Cette façon d'opérer nous a permis d'obtenir un milieu de parfaite conservation et pratiquement incolore, condition indispensable pour apprécier l'apparition et la disparition de colorations au cours de certaines de nos expériences.

B - ENSEMENCEMENT.-

Nous préparons tout d'abord la souche microbienne⁽¹⁾, conservée à la glacière, en faisant deux cultures successives de 24 heures sur gélose peptonée. Nous ensemençons

(1) Les caractères de cette souche d'origine urinaire, étiquetée J3 dans la collection du Laboratoire de Microbiologie ont été définis dans la thèse de Mme POUTEAU-THOUVENOT (75).

le produit de cette deuxième culture sur des boîtes de Pétri de façon à obtenir des colonies bien isolées (méthode de Koch). C'est au moyen d'une de ces colonies,ensemencée ensuite sur notre milieu synthétique, que nous obtenons la culture mère qui, après 18 heures de séjour à 37°, servira à l'ensemencement des tubes d'expériences.

C - MATÉRIEL ET MESURE DU DÉVELOPPEMENT BACTÉRIEN.-

Le matériel est lavé au mélange sulfochromique, rincé abondamment à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée, séché et stérilisé au four Pasteur ou à l'autoclave (pipettes graduées).

Les tubes que nous employons sont en verre pyrex, tous de même couleur et de même épaisseur; ils ont été calibrés et des essais de contrôle nous ont montré qu'ils présentent tous la même densité optique pour une même suspension de germes. Ainsi les résultats des mesures néphélométriques sont parfaitement comparables dans une même expérience.

Les mesures néphélométriques du développement bactérien sont effectuées au moyen du spectrophotomètre de Coleman, avec une lumière incidente d'une longueur d'onde de 610 mμ (longueur d'onde qui permet d'avoir, dans ce cas, le maximum de sensibilité de l'appareil). Cette méthode de mesure du développement bactérien, qui n'est pas exempte de critique comme l'ont signalé Ph. LASSEUR et A. DUPAIX (51) est sans aucun doute la plus commode et la plus communément employée et a donné satisfaction à nos prédécesseurs dans ce laboratoire.

Les résultats sont exprimés en densité optique qui est le logarithme de la transmittance:

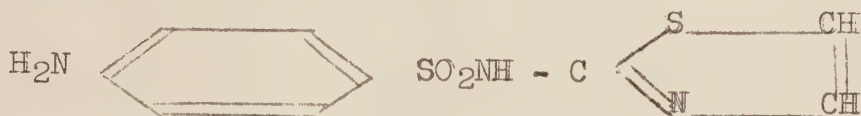
$$\text{densité optique} = -\log T$$

et nous avons suivi la pratique courante qui consiste à multiplier par 100 les chiffres de la densité optique. La densité optique est proportionnelle aux concentrations et aux opacités, quand la loi de Beer-Lambert s'applique comme c'est le cas pour nos cultures bactériennes.



D - SULFAMIDES EMPLOYÉES - SOLUTIONS.

Nous avons employé le sulfathiazol (thiazomide Spécia), qui est un dérivé de la p-aminobenzènesulfamide par substitution d'un atome d'hydrogène à l'azote de la fonction amide par le cycle thiazol:



Le colibacille est très sensible à cette sulfamide. Nous avons employé en général les concentrations deux millièmes (2.10^{-6}) qui est peu inhibitrice et cinq millièmes (5.10^{-6}) qui est moyennement inhibitrice. La solution mère qui nous a servi dans nos expériences in vitro. était une solution aqueuse au dix-millième (10^{-4}), faite par simple dissolution de 0,05 g de sulfathiazol dans 500 ml. d'eau distillée. Parfois il nous a fallu des solutions plus concentrées de sulfathiazol (solution à 1 p.100) pour nos essais in vivo par exemple. Dans ce cas le sulfathiazol a été dissous au moyen de la quantité minima de soude et le pH final de la solution ainsi obtenue variait entre 8,2 et 8,4.

Dans quelques cas particuliers, nous avons utilisé la p-aminobenzènesulfamide ou sulfanilamide et les concentrations employées se situent entre le dix-millième (10^{-4}) qui donne en général une inhibition moyenne et cinq cent millièmes (5.10^{-5}) qui donne une faible inhibition.

Toutes ces solutions de sulfamides, comme d'ailleurs celles des autres agents étudiés, étaient faites dans de l'eau distillée et filtrées sur bougie Chamberland. Si les solutions de sulfamides étaient conservées parfois assez longtemps (un à deux mois environ), les solutions faites avec d'autres corps étaient en principe renouvelées à chaque expérience.



E - TECHNIQUE D'UN ESSAI RÉALISÉ IN VITRO.-

Les tubes en verre pyrex de 18 mm de diamètre et calibrés contiennent 8 ml du milieu synthétique dont la composition a été indiquée ci-dessus, mais concentré dans la proportion de 5/4 de façon que 8 ml. de milieu concentré contiennent la même quantité de sels et de glucose que 10 ml de milieu habituel non concentré. Nous ajoutons alors les solutions stériles de sulfamide et de l'agent associé et nous complétons ensuite à 10 ml avec de l'eau distillée stérile. Cet artifice permet, d'une part de ne pas diluer le milieu par addition des solutions et, d'autre part, les volumes ajoutés étant variables, d'obtenir une concentration exactement connue des agents étudiés.

Chaque tube est alors ensemencé avec 0,2 ml. d'une suspension bactérienne d'une culture de 20 heures et ayant une densité optique de 22 (on dilue au besoin avec du sérum physiologique). Nous ajoutons donc sensiblement le même nombre de germes dans chaque tube; de nombreux auteurs ont en effet signalé que l'activité des sulfamides dépend beaucoup du nombre de germes de l'inoculum.

Chaque série d'expériences comprenait toujours trois types de témoins, en plus de l'essai:

- l'un (marqué T dans nos tableaux d'expériences) était constitué par du milieu synthétique (témoin de vitalité du germe).
- le deuxième (marqué S dans les tableaux) contenait du milieu synthétique additionné de sulfamide.
- le troisième (marqué P) recevait l'agent choisi.
- le type de ces tubes de l'expérience proprement dite (SP dans les tableaux) était constitué de milieu synthétique ayant reçu à la fois la sulfamide et l'agent choisi, employés aux mêmes doses que dans les témoins.

Les tubes sont rendus homogènes par agitation, puis mis à l'étuve à 37°. Après des temps de séjour à l'étuve

assez variables mais connus, le développement bactérien est apprécié à l'aide du spectrophotomètre de Coleman, après agitation soigneuse des tubes.

Dans chaque cas étudié, nous avons fait plusieurs expériences et les résultats publiés sont des moyennes.

F - TECHNIQUE D'UN ESSAI FAIT IN VIVO.-

Nous avons effectué nos expériences sur la souris, dans le cas des essais d'activité antibiotique tout au moins. Ces animaux provenaient, soit d'élevages locaux, soit du centre d'élevage du C.N.R.S. ils étaient conservés au moins 8 jours à la Faculté avant leur emploi.

Les souris, toutes à peu près de même poids et de même sexe dans une même série d'expériences, sont divisées en lots de nombre variable suivant le cas et laissées au laboratoire pendant 48 heures au moins avant l'expérience afin d'habituer les animaux à leur nouvelle condition de vie.

Le sulfathiazol, l'agent associé et la suspension infectante sont toujours administrés par voie intrapéritonéale; le volume total des liquides ne dépasse jamais 1,2 ml

Nous faisons toujours deux essais préliminaires:

- le premier fait avec des concentrations variables et croissantes d'une suspension de *Salmonella typhi murium* (issus d'une culture d'âge déterminé) a pour but de déterminer le volume d'inoculum qui entraîne la mort par infection en 24 à 48 heures.
- le second a pour but de déterminer la quantité de sulfathiazol qui ne guérit pas l'infection mais qui en retarde le développement; c'est cette dose subcurative qui sera la mieux adaptée à la mise en évidence d'une synergie de l'action antibiotique de la sulfamide et de l'agent associé. Cette dose est, en général, très voisine de 2 mg.

L'expérience comporte toujours cinq essais-témoins:

- un premier lot de souris reçoit simplement l'injection infectante de *Salmonella typhi murium* (dose létale en 24 à 48 heures).
- un deuxième lot est injecté simultanément avec du sulfathiazol et avec *Salmonella typhi murium*,
- dans le troisième lot on remplace la sulfamide par l'agent choisi,
- le quatrième lot sert de test de bonne tolérance de la souris à la drogue,
- les animaux de l'expérience proprement dite sont injectés avec la sulfamide, l'agent associé et la suspension de *S. typhi*, aux mêmes doses que dans les témoins.

Les doses de sulfathiazol employées ont été 1 mg et 2 mg.

La suspension de *S. typhi* qui entraîne la mort de la souris entre 24 et 28 heures, se situe entre 0,25 et 0,40 ml d'une suspension de *Salmonella typhi murium* dans du sérum physiologique et ayant une densité optique de 10 (les germes sont issus d'une culture de 18 à 20 heures).

G - TECHNIQUES DES EXPÉRIENCES FAITES AVEC L'APPAREIL MANOMÉTRIQUE DE WARBURG.⁽¹⁾.-

Les fioles et les manomètres correspondants sont jaugés au mercure par la méthode classique d'UMBREIT(86). L'inconvénient de cette méthode est la difficulté qu'il y a à réaliser l'affleurement du mercure de la fiole au niveau du trait de repère de l'entrée du manomètre. ZWART (97) a mis au point une méthode plus commode qui évite cet inconvénient.

(1) Nous remercions M.le Professeur MARCHAL et Mme POUTEAU-THOUVENOT qui ont eu l'amabilité de nous initier au fonctionnement de l'appareil de Warburg.

Les fioles sont nettoyées au mélange sulfochromique, abondamment rincées à l'eau distillée et séchées à l'étuve.

Lors de la mise en marche de l'expérience, chaque fiole reçoit une solution tampon contenant le substrat et les cellules dont on veut étudier la respiration, et dans la cupule centrale sont placés 0,2 ml d'une solution de potasse à 10 p.100 (la surface d'absorption est augmentée au moyen d'un petit papillon de papier filtre plongeant dans la solution potassique). L'ensemble des deux liquides occupe un volume de 3,2 ml.

Les fioles sont adaptées à leur manomètre respectif, après graissage des rodages à la vaseline. On les place alors dans le bain-marie de l'appareil réglé au préalable à 37° (70 oscillations par minute, amplitude 8 cm). On agite les fioles pendant au moins trois minutes pour réaliser l'égalisation des températures. Les robinets sont fermés et le liquide du manomètre est aussitôt affleuré à la graduation 18 (réalisation du volume constant). Cette dernière opération est renouvelée avant chaque lecture.

CHAPITRE II

PRÉPARATION ET PHARMACOLOGIE D'UN DÉRIVÉ MERCURIEL DE LA SULFANILAMIDE

L'association de sulfamides avec un sel mercurique a déjà été étudiée par KAYSER et HADOT (43) et s'est montrée particulièrement active.

Cela nous a incité à essayer de préparer un composé mercuriel d'une sulfamide pour rechercher si ce composé se comporterait, vis-à-vis d'un micro-organisme, comme le fait l'association sulfamide-chlorure mercurique ou si la combinaison organique du mercure avec la sulfamide communiquerait à la molécule ainsi formée des propriétés particulières, éventuellement intéressantes en thérapeutique. On pouvait, en effet, espérer:

1) un pouvoir de pénétration accru du mercure dans la cellule microbienne, par suite de sa liaison au groupement sulfamidique;

2) une plus grande efficacité antiseptique du mercure à cause de l'action du mercure organique moins brutale que celle du mercure minéral; (les pharmacologistes reprochent, en effet, au sublimé son action trop brutale qui précipite les protéines superficielles, formant barrière contre une pénétration plus profonde du mercure);

3) un fort abaissement de la toxicité par suite de la position présumée du mercure entre deux groupements contenant du soufre;

4) éventuellement, chez l'animal, une action diurétique.

A - PREPARATION DES DÉRIVÉS MERCURIELS DES SULFAMIDES.-

Dès 1939, MOUNEYRAT (64) avait pris un brevet très général pour l'obtention de nombreux sels de sulfamides, parmi lesquels le sel mercuriel, par action de sels métalliques sur le dérivé sodé de la sulfanilamide; aucun détail de préparation n'était donné et les produits obtenus n'étaient pas décrits.

WOJAHN (92) obtient des composés mercuriels de différentes sulfamides; en faisant agir une solution alcaline de chlorure mercurique sur des solutions aqueuses ou alcooliques faibles de ces sulfamides; mais sa méthode permet rarement d'aboutir à un composé défini, il obtient surtout des mélanges de sulfamides mercuriels.

Plus récemment, RODIGHIERO (77) indique la préparation de plusieurs dérivés mercuriels de la sulfanilamide. Il obtient d'abord un produit basique, $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH-HgOH}$ par action du chlorure mercurique sur la sulfanilamide en présence d'un excès de carbonate de sodium. Ce produit mercuriel traité par de l'acide chlorhydrique dilué dans des conditions appropriées donnerait un corps, de point de fusion 185° (méthode non indiquée), auquel RODIGHIERO attribue, sans beaucoup de preuves, la formule $(\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH})_2\text{Hg}$.

Enfin, DOLIQUE et MAS (22) viennent de publier une méthode originale: ils opèrent une double décomposition entre le sulfamidate de calcium, préparé extemporanément en milieu méthanolique, et un sel de mercure, également en solution dans le méthanol.

Nous avons mis au point une technique de préparation plus simple que les dernières que nous avons citées, en mettant à profit le fait qu'un hydrogène de la fonction amide est mobile et salifiable par le mercure, même s'il est offert sous forme d'oxyde jaune insoluble; les sulfamides possèdent également cette propriété; la réaction

serait donc:

$2 \text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH}_2 + \text{OHg} = \text{H}_2\text{O} + (\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH})_2\text{Hg}$
montrant qu'il faut deux molécules de sulfanilamide pour salifier une molécule d'oxyde de mercure.

Mode opératoire:

0,02 mol. (soit 3,44 g) de sulfanilamide

0,01 mol. (soit 2,16 g) d'oxyde jaune de mercure
(passé au tamis N°200)

sont dispersés dans 100 à 150 ml d'eau distillée et le tout est agité pendant 15 à 20 heures.

La coloration propre à l'oxyde jaune disparaît peu à peu pour faire place à un produit blanc neigeux, insoluble. Il ne faut pas chauffer, la chaleur freinant la réaction par suite de l'hydrolyse du produit mercuriel ainsi formé.

En fin de réaction, il reste encore quelques grains d'oxyde jaune qui se déposent au fond du récipient par suite de leur forte densité. On les sépare par décantation. Mise en suspension et décantation sont renouvelées plusieurs fois jusqu'à élimination totale de l'oxyde restant, ce qu'il est facile de contrôler tant les grains d'oxyde se déposent rapidement et sont aisément discernables.

La suspension est alors filtrée sur Buchner, lavée abondamment à l'eau, puis à l'alcool à 95°, enfin à l'éther et séchée dans un dessiccateur à vide.

Le rendement est environ 70 %, il pourrait être fortement amélioré par récupération du produit perdu lors des décantations.

Analyse

Le dosage de l'azote total a été fait par Kjeldahlisation et distillation de l'ammoniaque dans l'appareil de Parnas et Wagner. Les dosages, ayant porté sur des échantillons de lots différents, ont donné pour résultat, rapporté à 100 g de produit:

10,72 10,16 10,40 moyenne 10,43
(calculé pour la formule p.15: 10,33 g pour 100 g)

Le dosage du mercure a été effectué suivant deux procédés:

- 1) par précipitation, sous forme de sulfure, par l'action de H_2S en milieu acide, et pesée; la présence de sulfamide ne gêne pas le dosage et la destruction de la matière organique n'est pas nécessaire;
- 2) par la méthode cyanoargentimétrique de DENIGES (21). La matière organique est détruite par le perhydrol en présence d'acide sulfurique concentré et à l'ébullition sous réfrigérant à reflux; l'opération demande deux à trois heures. La destruction par le chlore naissant $ClH-ClO_3K$) que nous avons essayée tout d'abord, est plus longue et ne nous a pas donné satisfaction car il se forme un précipité jaunâtre qui gêne l'appréciation du virage final.

Les résultats obtenus sont les suivants, exprimés en grammes de mercure pour 100 grammes de sulfamide mercuriel:

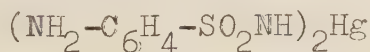
34,4 33,6 34,3 33,9 moyenne 34,05
(calculé pour la formule p.15: 36,9 g pour 100 g)

On voit que les valeurs trouvées sont un peu faibles pour la formule proposée; on pouvait penser que cela était dû à la présence d'un peu de sulfanilamide libre qui serait entraîné mais un traitement par l'acétone, puis par le benzène bouillant, n'a pas donné de valeur plus élevée.

Le dosage de la sulfanilamide salifiée a été effectué par la méthode colorimétrique classique de BRATTON et MARSHAL (12) et fournit une valeur de 60 pour 100 (calculé pour la formule ci-dessous 63,10 pour 100).

Formule

Nous pensons que la formule suivante peut s'appliquer au produit que nous avons préparé:



La composition centésimale trouvée concorde assez bien

avec les valeurs calculées; le rapport du nombre de molécules de sulfanilamide au nombre d'atomes de mercure, qui devrait être 2 d'après la formule, est 2,05 d'après les valeurs trouvées.

Le mercure étant entièrement et rapidement déplaçable par H_2S est donc sous forme salifiée et non sous forme plus ou moins complexée, ce que notre formule met en évidence. Enfin, la diazotation suivant BRATTON et MARSHAL montre que la fonction amine aromatique est sûrement libre, ce dont la formule rend également compte.

B - PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU SULFAMIDATE DE MERCURE PRÉPARÉ PAR NOUS.-

Ce produit est une poudre blanche micro-cristalline. Placé sur un bain de mercure, il se décompose, se sublime en même temps qu'il fond, vers 215° .

Il est insoluble dans l'eau, très peu soluble dans les solvants organiques, insoluble dans les alcalis et difficilement soluble (avec décomposition) dans les acides.

Le sulfamidate de mercure est légèrement soluble dans une solution à 1 p.100 de chlorure d'ammonium (0,08g p.100). Au contraire, l'iodure de potassium ne le dissout qu'en le décomposant. Le glyocolle et l'histidine, en solution à 1 p.100, en dissolvent respectivement 0,10 et 0,15 g pour 100 g.

Ces diverses solutions sont stables. C'est ainsi qu'une solution contenant 0,01 g de produit mercuriel et 0,10 g de chlorure d'ammonium pour 100 g d'eau, conserve inchangées ses propriétés antibactériennes pendant un an au moins.

Le produit en solution dans le chlorure d'ammonium, le glyocolle ou l'histidine, donne avec la soude un précipité blanc, sans doute l'hydroxyde de mercuri-sulfanilamide.

L'hydrogène sulfuré ou le sulfure de sodium, donnent presque instantanément un précipité de SHg à partir des solutions de sulfamide mercuriel dont les solvants ci-dessus indiqués.

C - PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES.-

1 - Action antibactérienne:

Nous n'avons pas trouvé trace, dans la bibliographie systématique que nous avons faite, de mesure de l'activité antibactérienne du sulfamidate de mercure. BENIGNO (8) a bien fait une étude de ce caractère sur des dérivés mercuriels des sulfamides préparés par RODIGHIERO (77), mais le composé qui nous intéresse n'a pas été essayé; ceux qui ont été testés par ces auteurs italiens semblent moins efficaces que notre produit.

Nos essais de développement de Esch.coli en milieu synthétique, ont été faits dans les conditions indiquées p.5, en présence de différentes concentrations de sulfamidate de mercure dissous dans vingt fois son poids de glyocolle. Les résultats obtenus figurent dans le tableau N°1

TABEAU N° 1

Temps en heures	Densité optique (x 100) des tubes contenant du sulfamidate de mercure aux concentrations indiq.						
16	26	25	0 à 26	17	0	0	0
24	27	25	0 à 27	27	0	0	0
48	27	26	0 à 27	27	0 à 26	0	0
75	27	27	0 à 27	27	0 à 26	0	0
Concentrat. sulfami- date-Hg (x 10 ⁶)	0,5	0,8	1	2,5	5	7	10

Ainsi le sulfamidate de mercure est totalement inhibiteur de tout développement de Esch.coli lorsqu'on l'emploie à des concentrations supérieures au deux-cent millièmes et parfois même au millionième.

En remplaçant Esch.coli par d'autres germes, nous avons eu des résultats du même ordre, mais l'efficacité est un peu moindre. C'est ainsi qu'il faut une concentration du cent millièmes pour inhiber totalement le développement de Serratia marcescens et une concentration du cinquante millièmes pour inhiber celui de B.lactis niger.

Nous avons voulu comparer les effets de notre produit à ceux que donnent la sulfanilamide, le chlorure mercurique et leur association.

HADOT (30), dans des conditions analogues, avait trouvé que le chlorure mercurique était bactériostatique dès la concentration du millionième; dans nos essais il a fallu atteindre une concentration quintuple pour obtenir cet effet. De toutes façons, les doses actives de notre sulfamidate de mercure et du sublimé sont du même ordre.

Il nous a fallu atteindre des concentrations en sulfanilamide de l'ordre du cent-millième pour obtenir un effet bactériostatique net, encore la pousse microbienne commençait-elle au bout de 48 heures.

L'activité de l'association sulfathiazol-chlorure mercurique avait déjà été étudiée par HADOT (30); nous avons voulu faire de nouvelles expériences en associant les deux agents: sulfanilamide et sublimé, de façon à ce que le rapport des molécules de sulfanilamide au nombre d'atomes de mercure soit, dans l'association, le même que dans le sulfamidate de mercure, soit 2 à 1. Les résultats obtenus (voir tableau N°2) montrent qu'un effet inhibiteur net et prolongé pendant 48 heures au moins, peut s'obtenir avec des concentrations 4,6 et $2,4.10^{-6}$

respectivement en sulfanilamide et ions mercuriques.

TABLEAU N° 2

Concentration en ions Hg (x 10 ⁶)	Concentration en sulfanil- amide (x 10 ⁶)	Densité optique (x 100) des tubes contenant l'association chlorure mercurique-sulfanilamide au bout de		
		16 heures	24 heures	48 heures
0,18	0,32	24	28	28
0,26	0,54	21	28	28
0,37	0,63	14	28	28
0,9	1,6	0	10	29
1,8	3,2	0	0	35 à 0
2,4	4,6	0	0	0
Témoin		24	28	28

Enfin, nous avons voulu comparer le pouvoir antiseptique du sulfamidate de mercure à celui d'un dérivé mercuriel fréquemment employé, le borate de phénylmercure (hydro-morphène Médial). Ce dernier est nettement plus actif puisque, à la concentration du demi-millionième, il empêche, pendant 48 heures au moins, tout développement bactérien de Esch coli. dans notre milieu synthétique habituel.

En résumé: le sulfamidate de mercure que nous avons préparé a un pouvoir antiseptique comparable à celui d'une association de sulfanilamide et de chlorure mercurique faite dans les mêmes proportions que celles de ces corps dans le sulfamidate; l'activité est donc beaucoup plus forte que celle de la sulfanilamide et l'effet antibactérien est analogue à celui que l'on obtiendrait avec poids égal de sublimé. Comme on pouvait s'y attendre, puisque le mercure est salifié et non dissimulé, le sulfamidate de mercure se comporte comme un sel mercurique et non comme un sulfamidé.



2 - Etude de la toxicité:

Quelques essais ont d'abord montré que, per os, le sulfamidate de mercure était, pour la souris, beaucoup moins toxique que le sublimé.

Administrées au cobaye par voie intrapéritonéale, des doses inférieures à 1 mg de sulfamidate de mercure n'ont jamais amené d'oligurie (sauf chez un animal sur 5 injectés).

Trois cobayes, auxquels nous avons administré par la même voie 5 mg de sulfamidate de mercure dissous dans 5 ml. de solution glycocolle à 1 p. 100, ont survécu, mais après avoir présenté une anurie prolongée.

L'injection de 10 mg de produit (dissous dans 10 ml. de solution à 0,5 p.100 de glycocolle et d'histidine à parties égales n'a provoqué la mort de l'animal que dans deux cas sur trois.

3 - Action sur la souris infectée expérimentalement:

Nous avons d'abord cherché quelle était la quantité de germes qu'il fallait injecter à la souris, par voie intrapéritonéale, pour obtenir la mort par infection en 24 à 48 heures. Il nous a fallu pour cela 0,3 ml. d'une suspension de S.typhi murium dans du sérum physiologique présentant une densité optique de 10.

En même temps que la suspension de germes, nous avons injecté, à 40 souris au total, des doses de sulfamidate de mercure comprises entre 0,02 et 0,12 mg. La mort des animaux n'a pu être prévenue, ni retardée, par rapport à celle des animaux témoins. Ainsi l'important effet antibactérien trouvé in vitro n'est pas reproductible in vivo.

4 - Etude de l'effet diurétique:

L'animal de choix, pour une telle étude, est le chien mais n'en n'avant pas à notre disposition, nous avons dû nous contenter d'essais sur le cobaye et nos expériences n'ont porté, au total, que sur 14 animaux.

Les cobayes ne supportent pas bien l'absorption de liquides; aussi, pour les hydrater autant que possible, les avons-nous nourris avec des bouillies de légumes et des carottes. Ils se sont bien accommodés de cette nourriture et dans des périodes d'observation, leur diurèse était relativement constante, environ 50 ml par jour.

A un premier cobaye, qui urinait environ 50 ml par 24 heures, nous avons injecté, par voie intrapéritonéale 0,5 mg de sulfamidate de mercure, additionné de 5 mg de glycocolle et dissous dans 5 ml de sérum physiologique. La solution a été filtrée sur bougie. Les quantités d'urine recueillies ont été les suivantes:

jours	1°	2°	3°	4°	5°
vol. (en ml)	150	120	90	45	35

Nous avons alors injecté au même animal, 2 mg de produit; le volume des urines a été:

jours	1°	2°	3°
vol. (en ml)	10	20	25

Les expériences que nous avons pratiquées ensuite ont porté sur les lots de trois animaux, de façon à diminuer l'influence de la sensibilité individuelle. Le poids ~~des~~ animaux était d'environ 500 g.

L'injection de 0,3 mg de sulfamidate de mercure faite à un premier groupe de 3 animaux a diminué la diurèse moyenne qui est passée de 160 ml à 110 ml pour le 1° jour et à 140 pour le 2° jour.

A un deuxième groupe d'animaux, on pratique une injection un peu plus forte de produit: 0,5 mg.; là, au contraire, la diurèse a légèrement augmenté et est passée de 140 à 160 ml par jour.

Alors que nous pensions obtenir de l'anurie en injectant à un nouveau groupe de 3 animaux la dose de 0,8mg par animal, l'effet a été assez nettement diurétique et le volume d'urine recueilli a passé de 120 à 200 ml. par jour.

Enfin l'injection de 1 mg. de sulfamidate de mercure faite à chacun des trois cobayes formant le dernier lot, a provoqué un blocage du rein et l'anurie a subsisté, presque totale, pendant 8 jours; puis la diurèse a repris puisqu'on a récolté alors 75 ml d'urine.

Ainsi, le sulfamidate de mercure, comme tous les sels mercuriques, possède un net pouvoir diurétique; chez le cobaye cependant, ces effets sont irréguliers; la dose diurétique se situerait aux environs de 1 mg par kilogramme d'animal.

Nous n'avons pas poursuivi plus avant nos expériences dans ce sens car la thérapeutique possède avec le neptal et les corps à formules voisines (novasurool, salyrgan) des diurétiques assez satisfaisants. On propose d'ailleurs très fréquemment de nouveaux diurétiques mercuriels à la thérapeutique, dont les caractéristiques paraissent excellentes: l'un des derniers en date est le mercuri-I-allyl-3-7diméthylxanthine, spécialisé sous le nom de Rediron (91).

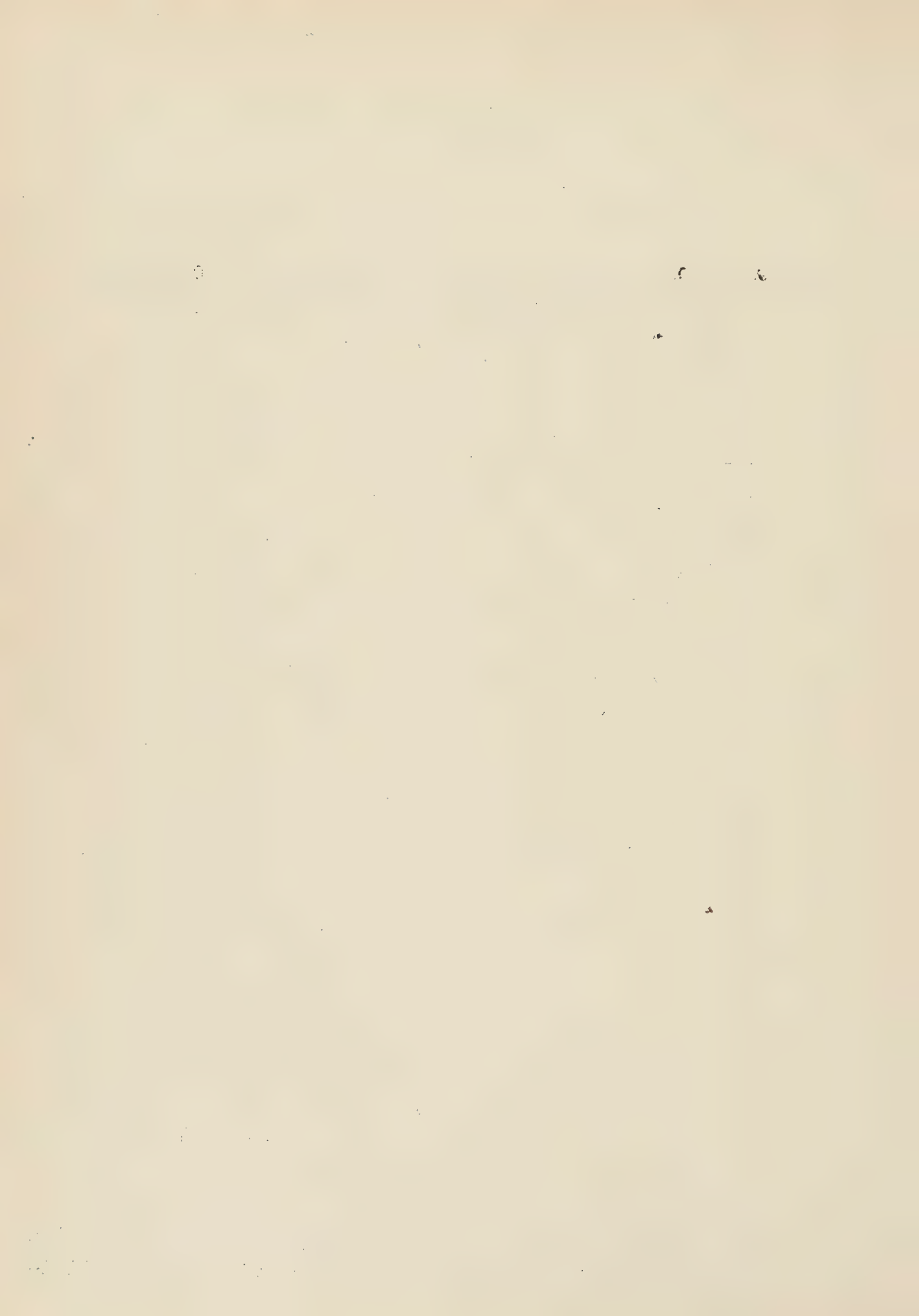
En résumé: nous avons indiqué un mode facile d'obtention d'un dérivé mercuriel de la sulfanilamide, auquel nous avons attribué la formule d'un sulfamidate mercurique $(\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH})_2\text{Hg}$. Les propriétés pharmacologiques de ce corps sont celles de l'ion mercurique; le pouvoir antibactérien est égal à celui du chlorure mercurique mais les effets sur le développement de l'infection par *Salmonella typhi murium*, chez la souris, sont nuls. La toxicité est relativement faible (deux centigrammes par Kg de cobaye). L'effet diurétique existe, mais est inconstant.

Chapitre III

ÉTUDE D'ASSOCIATIONS A BASE DE SULFAMIDES.

A) ASSOCIATIONS AVEC DES AGENTS SUSCEPTIBLES DE FORMER DES SYSTEMES OXYDO-RÉDUCTEURS: (hydroquinone, quinone et naphthohydroquinone substituée)-

HADOT(30) avait montré que certains corps oxydants et que certains corps réducteurs sont synergiques des sulfamides, mais que cette propriété n'est pas générale. Par exemple, si le chlorate de potassium renforce l'action de la sulfanilamide, d'autres oxydants tels que les persels sont sans action; si les phénols potentialisent parfois l'action antibiotique des sulfamides, le sulfoxylate de sodium est inactif. Peut-être, avons-nous pensé, seraient particulièrement synergiques des sulfamides les corps susceptibles de présenter dans les milieux biologiques un équilibre d'oxydo-réduction. De tels corps pourraient agir sur la molécule de sulfamide en l'oxydant ou en la réduisant, donnant ainsi naissance à des corps actifs. Dès 1937, l'hypothèse avait été avancée que la sulfamide agissait sous une forme oxydée, la p-hydroxylaminobenzène sulfanilamide (par transformation du $-NH_2$ arylaminé en $-NHOH$) très active in vitro (in HENRY - 34); comme les diverses associations que nous avons tentées étaient pratiquement inactives in vivo, nous pouvions penser qu'un tel mécanisme (oxydation de la sulfamide en dérivé hydroxylaminé) rendrait compte de nos échecs. Signalons que l'association à des sulfamides, de colorants présentant un équilibre d'oxydo-réduction dans les conditions biologiques, a parfois été tentée: TAILLAN-TER (84) indique que les colorants vitaux tels que le Rouge Congo et le Trypan Bleu favorisent l'action de la sulfanilamide et la transformeraient en dérivé hydroxylaminé; HANDOVSKY (32), par contre, montre que l'association à la fluorescéine n'augmente pas l'activité spirochétici-



de des sulfamidés, GOTS et SEVAG (29), mettent en évidence une compétition entre le sulfathiazol et le Bleu de méthylène vis-à-vis de la glucose-déshydrogénase des pneumocoques I.

Ces considérations nous ont amené à essayer parallèlement l'action de l'hydroquinone et de la benzoquinone en association avec une sulfamide. L'apparition et la disparition de colorations au cours des expériences sur le développement de Esch.coli renforçait notre pensée que des phénomènes d'oxydo-réduction étaient en cause. Nous avons ainsi été amené à étudier les variations du pH dans nos expériences. Enfin, nous avons étudié sommairement l'action d'un dérivé phénolique particulier (naphtohydroquinone substituée) sur le développement bactérien en présence ou en l'absence de sulfamide.

1°) ASSOCIATION SULFATHIAZOL-HYDROQUINONE.

POUCHOL (74) avait montré que, parmi les phénols essayés par lui, l'hydroquinone était le plus actif potentialisateur de l'action de la sulfanilamide. Nous avons voulu étendre ses résultats au cas du sulfathiazol et, surtout, faire des essais d'activité de l'association in vivo.

Essais in vitro: Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant:

Tableau n° 3...

TABEAU N° 3

Concentration en hydroquinone et sulfathiazol en association à concentration égale	Densité optique. (x 100) des tubes au bout de :			
	13 h.	20 h.	48 h.	72 h.
10 ⁻⁶	17	17	18	25
2.10 ⁻⁶	16	15	20	26
4.10 ⁻⁶	13	14	18	25
10 ⁻⁵	6	13	14	20
Concentration en sulfathiazol seul				
10 ⁻⁶	13	23	23	27
2.10 ⁻⁶	18	18	23	27
4.10 ⁻⁶	14	17	20	26
10 ⁻⁵	10	16	18	25
Témoin	17	20	22	29

Dans le tableau ci-dessus les associations ont été faites à concentrations égales en hydroquinone et en sulfathiazol tandis que dans le tableau N° 6 p. 31 figurent des résultats obtenus avec deux fois plus d'hydroquinone que de sulfamide. L'ensemble des résultats montre que, pour les concentrations inférieures au cent-millième, l'hydroquinone n'a pas d'action notable sur le développement de Esch.coli; aux concentrations utilisées le sulfathiazol est inactif ou peu actif (léger retard de croissance); l'association à poids égaux est légèrement plus active que chacun des corps employés seuls; l'association de deux parties de sulfathiazol

pour une d'hydroquinone est très nettement bactériostatique alors même que ses constituants sont sans action notable à ces concentrations.

Essais in vivo.

Nous avons opéré sur la souris infectée par *Salmonella typhi murium* et nous avons cherché la quantité de germes à injecter par voie intrapéritonéale, pour obtenir la mort, par infection, en 24 à 48 heures. Il nous a fallu pour cela 0,35 ml d'une suspension de *Salmonella* dans du sérum physiologique présentant une densité optique de 12,5; ces bactéries provenaient d'une culture de 18 heures.

Les doses de sulfathiæzol et d'hydroquinone employées seules ou associées sont respectivement 2 mg et 1 mg; ces doses sont administrées à trois reprises à 5 heures d'intervalle.

Tableau n° 4...

TABLEAU N° 4

Effet d'injections répétées de sulfathiazol et d'hydroquinone (employés seuls ou en mélange) sur la souris infectée par *S. typhi murium*.

Nombre d'animaux traités	Sulfa-thiazol	Hydro-quinone	Nombre total d'animaux morts en				
			10 h.	24 h.	56 h.	72 h.	96 h.
5	3 inj.de 2 mg	0	0	0	0	3	5
3	0	3 inj.de 1 mg	1	1	1	3	
4	3 inj.de 2 mg	3 inj.de 1 mg	0	0	0	0	0
5	Témoins non traités		1	3	5		

Dans cette expérience, l'avantage de l'association est net; seules les souris qui ont reçu l'association survivent. Mais d'autres expériences ont donné des résultats défavorables; il est vrai que nous avons alors administré les antibiotiques en une seule fois et non en trois injections espacées. Les résultats sont notés dans le tableau suivant:

TABLEAU N° 5

Effet du sulfathiazol et de l'hydroquinone (employés seuls ou en mélange) sur la souris infectée par *S. typhi murium*.

Nombre d'animaux	Sulfa-thiazol injecté en mg	Hydro-quinone injectée en mg	Nombre total d'animaux morts en	
			24 h.	48 h.
9	2	0	7	9
3	1,7	0	3	
2	0	1	2	
9	2	1	5	7
7	1,7	1	3	6
9	Témoins non traités		6	8

Les avantages de l'association sont moins nets ici que dans l'expérience précédente: la proportion des animaux morts après traitement par l'association est à peine moins élevée que chez ceux traités par le sulfathiazol ou l'hydroquinone seuls.

Dans une autre série d'expériences où nous avons employé différentes doses de sulfathiazol et d'hydroquinone, tous les animaux sont morts et l'association s'est bornée à retarder la mort des animaux traités.

On peut conclure de ces expériences que la synergie sulfamide-hydroquinone est bien moins nette in vivo qu'elle ne l'est in vitro et les avantages d'une telle association semblent donc insuffisants pour qu'on soit tenté d'en poursuivre l'étude plus avant.

Nous avons voulu cependant approfondir cette étude et voir si une modification chimique du diphénol n'intervenait pas, laissant présager une interaction possible avec le sulfamidé ou avec un constituant cellulaire. De fait, au cours de ces expériences, nous avons pu constater qu'en mélangeant des solutions de sulfathiazol sous forme de sel de sodium (légèrement alcalines pH 8 environ) et d'hydroquinone, il y avait apparition d'une coloration brune s'intensifiant avec le temps. Cette coloration est due à l'oxydation de l'hydroquinone au contact de l'air, car elle a son maximum d'intensité au niveau de la surface du liquide; il y a sans doute formation de quinone puis oxydation de la quinone en mélanines. Mais comme cette oxydation ne se produit pas en solution acide ou neutre et que, d'autre part, on obtient le même effet en ajoutant un alcali à une solution d'hydroquinone, nous pensons

que la sulfamide n'intervient pas par elle-même, mais simplement par le pH alcalin de sa solution.

Semblables phénomènes ont d'ailleurs été signalés par d'autres chercheurs. HADOT (30) avait trouvé qu'une solution de pyrogallol à 1 pour 100 laissée à l'air et à la lumière pendant deux jours, brunissait mais conservait son action bactériostatique. DALLEMAGNE et DEROUAUX (18) ont signalé, à propos du pyrocatéchol, une augmentation du pouvoir bactéricide avec le temps de contact du microbe et de l'antiseptique, ce qui pourrait correspondre à une oxydation du phénol. L'oxydation que nous avons signalée plus haut était-elle la cause de l'augmentation du pouvoir bactériostatique du mélange sulfathiazol-hydroquinone? Pour nous en assurer, nous avons laissé en contact pendant deux mois 1 g de sulfathiazol et 0,5 g d'hydroquinone dans 100 ml d'eau à l'air et à la lumière. Le pouvoir bactériostatique de cette solution, qui avait pris une forte coloration brune, a été comparé à celui d'une solution extemporanée de ces deux mêmes corps. Les résultats que nous avons obtenus (Tableau N° 6) confirment le renforcement du pouvoir bactériostatique de l'association et montrent, en outre, qu'après vieillissement de deux mois, elle reste active, mais moins que la solution fraîche et un peu moins que le sulfathiazol seul. (x)

(x) On aurait pu craindre que le brunissement des solutions ne rende les mesures opacimétriques incorrectes; l'emploi du spectrocolorimètre de COLEMAN avec une lumière incidente de longueur d'onde 610 m μ permet d'éliminer complètement l'influence de la coloration des solutions oxydées.

TABLEAU N° 6

Comparaison de l'action sur la croissance de Esch. coli
des solutions extemporanée et vieillie de sulfathiazol-hydroquinone

Temps en heures	Concen- tration en sulfa- thiazol (x 10 ⁶)	Densité optique	Concen- tration en hydro- quinone (x 10 ⁶)	Densité optique	Association sulfathiazol+ hydroquinone	
					solution extempo- ranée	solution vieillie
15	1	33	0,5	36	16	35
24	1	40	0,5	40	41	42
48	1	44	0,5	54	44	54
15	5	7	2,5	36	6	13
24	5	21	2,5	43	14	41
48	5	31	2,5	53	27	54
15	10	6	5	31	3	12
24	10	16	5	40	6	25
48	10	19	5	49	12	30
15	15	5	7,5	22	4	6
24	15	15	7,5	43	7	13
48	15	15	7,5	49	10	28
15	20	4	10	9	3	6
24	20	14	10	42	7	12
48	20	14	10	49	9	18
15	25	4	12,5	3	2	4
24	25	15	12,5	44	5	10
48	25	15	12,5	47	9	21
15	30	4	15	4	2	5
24	30	14	15	17	5	10
48	30	14	15	41	8	17

En résumé: l'association de l'hydroquinone au sulfathiazol renforce son action in vitro, mais in vivo, l'action synergique est peu nette et inconstante. La coloration du mélange hydroquinone-sulfathiazol, qui augmente avec le temps, s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de l'association et ne saurait donc être la cause de la synergie.

2°) ASSOCIATION SULFATHIAZOL-BENZOQUINONE.

L'étude de l'association sulfamide-hydroquinone nous a logiquement conduit à celle de l'association sulfamide- benzoquinone. D'ailleurs si l'action bactériostatique des quinones a donné lieu à de nombreuses publications, notamment d'HOFFMANN-OSTENHOF, nous n'avons pas trouvé d'étude systématique de l'association de ces corps avec les sulfamides dans la littérature.

Le mode d'action des quinones semble bien différent de celui des sulfamides. Les auteurs ont reconnu plusieurs processus intervenant dans leur action bactéricide ou bactériostatique qui ont été bien résumés par HOFMANN-OSTENHOF et coll.(37). L'action des quinones serait diverse et dépendrait de leur concentration; elle serait "tannante" aux fortes concentrations et les modifications de la membrane empêcheraient la division cellulaire d'être normale; aux faibles concentrations elle serait inhibitrice d'enzymes et surtout des deshydrogénases; l'action oxydante des quinones sur les groupements -SH ne paraît pas jouer un rôle prépondérant dans la détermination de leur pouvoir antibactérien. BAYLEY (7) dans la revue qu'il a faite de "l'étude du mode de l'action antibiotique des quinones", rapporte des travaux de GEIGER et de RINDERKNECHT, suivant lesquels les quinones n'inactivent les groupements -SH des biocatalyseurs que dans le cas des bactéries Gram-, indiquant ainsi la complexité du problème.

Bien que, comme l'a fait remarquer NASSI (65), la toxicité de la benzoquinone doive à priori faire renoncer à l'espoir de l'employer en thérapeutique, l'association sulfamide-benzoquinone nous a paru intéressante à étudier comparativement à l'association sulfamide-hydroquinone, d'autant plus que l'oxydation que nous avons notée pouvait laisser penser que l'hydroquinone se transformait partiellement en quinone.

Les résultats de cette association sont notés dans le tableau suivant:

TABLEAU N° 7

Concentration en sulfathiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant la benzoquinone seule(P) ou associée au sulfathiazol (SP)				
					<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
0	15	20	-	P	23	12	2	0
	24	22	-	P	31	13	4	0
	48	25	-	P	33	34	17	0
10 ⁻⁶	15	-	12	SP		0	0	0
	24	-	28	SP		0	0	0
	48	-	28	SP		1	2	0
2.10 ⁻⁶	15	-	13	SP		1	0	0
	24	-	14	SP		3	1	0
	48	-	14	SP		18	2	0
5.10 ⁻⁶	15	-	5	SP	4	1	1	0
	24	-	7	SP	7	2	1	0
	48	-	8	SP	11	4	1	0
Concentration en benzoquinone					10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁵

La benzoquinone est très active par elle-même puisqu'elle fournit une bactériostase de plus de 48 heures dès que sa concentration est plus grande que le cent-millième. A concentration plus faible, la quinone est peu active ou inactive; l'association avec du sulfathiazol au millionième suffit cependant à faire naître une bactériostase complète pendant près de 48 heures.

Des concentrations croissantes en quinone (jusqu'au millième) seules ou associées au sulfathiazol, sont également bactériostatiques: il n'y a pas de levée d'inhibition.

Dans une autre série d'expériences (tableau N°8), nous avons associé systématiquement des concentrations égales de sulfathiazol et de quinone et nous avons comparé les résultats à ceux inclus dans le tableau N°7, donnés par la quinone seule et par le sulfathiazol seul

TABLEAU N° 8

Effets de l'association sulfathiazol-benzoquinone à concentrations égales

Temps en heures	Densité optique (x 100) des tubes contenant la benzoquinone associée au sulfathiazol à concentration égale			
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
13	12	6	1	1
20	16	15	4	1
48	21	18	15	2
72	27	25	22	11
Concentration en quinone et en sulfathiazol	10^{-6}	2.10^{-6}	4.10^{-5}	10^{-5}

Là encore, l'association est bien plus active que chacun des corps employé seul à la même concentration.

Nous avons déjà signalé le brunissement des solutions contenant l'association de l'hydroquinone avec la sulfamide (voir p.29) et nous l'avons attribué à l'oxydation de l'hydroquinone par l'air en milieu alcalin. Rien d'étonnant, dans ces conditions, à ce que nous retrouvions un brunissement analogue des solutions contenant la quinone associée au sulfathiazol au pH légèrement alcalin 7,2 des milieux de cultures employés. Cette remarque en introduit une autre: quand il y a développement, la coloration dérivée de l'hydroquinone com-

me de la quinone disparaît. Ce qui laisse supposer que la quinone et ses produits d'oxydation sont transformés. Or, le fait est connu que Esch.coli réduit certaines substances chimiques: MARCHAL J.G. et GIRARD Th.(59) ont montré qu'il réduit le molybdate d'ammonium en sous-oxyde de molybdène; de même ce germe transforme certaines matières colorantes en leucobases. Nous avons donc pensé que la quinone et ses produits d'oxydation devaient être réduits en hydroquinone. En effet quand le développement bactérien est juste encore possible (concentration en quinone 10^{-5}), la quinone disparaît peu à peu, ce dont on s'aperçoit parce que l'addition de IH ne donne plus I colorable par l'emploi d'amidon. Parallèlement devient possible la mise en évidence de phénols: le réactif de Millon et celui de Folin et Denis donnent des réactions positives.

Nous avons pu vérifier que la réduction de la quinone n'était pas due à la présence de glucose dans le milieu et que la libération d'iode s'effectuait normalement dans le milieu synthétique que nous utilisons. Un essai témoin nous a montré également que les réactions des phénols n'étaient pas dues aux produits du métabolisme cellulaire ayant diffusé dans le milieu de culture.

En conclusion: aux concentrations étudiées (10^{-5} et 5.10^{-5}), le colibacille fait disparaître totalement la quinone ajoutée au milieu de culture; il se forme un corps à fonction phénol, vraisemblablement l'hydroquinone. On peut voir là un processus de défense du bacille contre l'action toxique de la quinone. En effet, à concentration égale, l'hydroquinone est environ quatre fois moins active que la quinone (Tableau N°9).

TABLEAU N° 9

Comparaison de l'activité bactériostatique de la quinone et de l'hydroquinone en solutions récentes.

Concentration en	Densité optique (x 100) des tubes en			
	13 h.	20 h.	48 h.	72 h.
Quinone				
10 ⁻⁶	6	18	20	28
2.10 ⁻⁶	1	16	17	25
4.10 ⁻⁶	1	16	18	24
10 ⁻⁵	4	6	12	24
Hydroquinone				
10 ⁻⁶	21	22	23	32
2.10 ⁻⁶	8	19	20	29
4.10 ⁻⁶	6	19	22	31
10 ⁻⁵	1	19	24	31

Nous nous sommes demandé si le produit coloré formé à partir de la quinone en milieu sulfamide et à pH alcalin, était responsable de tout ou partie de l'activité bactériostatique de la quinone. Nous avons vu que le brunissement des solutions d'hydroquinone-sulfathiazol s'accompagnait d'une perte d'activité. Le même phénomène a lieu avec les solutions alcalines quinone-sulfathiazol, laissant penser que les produits d'oxydation de l'hydroquinone et de la quinone sont identiques.

Nous avons fait dissoudre avec un peu de soude 1 g de sulfathiazol et 1 g de quinone dans 100 ml d'eau distillée et nous avons conservé la solution pendant deux mois; la solution a bruni, elle a ensuite été diluée dans du milieu de culture de façon à réaliser des concentrations comprises entre 10⁻⁵ et 10⁻⁶ etensemencée avec Esch.coli. La croissance microbienne a été comparée à celle obtenue dans une solution extemporanée des mêmes

agents aux mêmes titres. Les résultats (voir tableau N°10) montrent que la solution vieillie reste active, moins cependant que ne l'est la solution extemporanée. En comparant ces résultats avec ceux indiqués dans le tableau N°9, on voit que la solution vieillie de quinone-sulfathiazol reste plus active que les solutions récentes ou vieilles d'hydroquinone et de sulfathiazol. Ceci indique que l'oxydation des solutions étudiées ne transforme qu'un petit nombre de molécules d'hydroquinone ou de quinone; les actions propres de ces deux corps subsistant en grande partie.

TABEAU N° 10

Concentration en quinone et sulfathiazol. (concentration égale)	Densité optique (x 100) des tubes contenant l'association quinone-sulfathiazol en solution récente et vieillie au bout de							
	solution vieillie				solution récente			
	13 h.	20 h.	48 h.	72 h.	13 h.	20 h.	48 h.	72 h.
10 ⁻⁶	18	18	19	26	12	16	21	27
2.10 ⁻⁶	13	14	18	25	6	15	18	25
4.10 ⁻⁶	10	15	18	25	1	4	15	22
10 ⁻⁵	1	13	14	23	1	1	2	11

Puisque l'hydroquinone est moins active que la benzoquinone et que, d'autre part, le colibacille est capable de réduire cette dernière en hydroquinone, il semble que l'action bactériostatique à un moment donné, dépende du taux de réduction de la quinone ou encore du potentiel d'oxydo-réduction du mélange. L'inhibition du développement des micro-organismes en fonction du rH des milieux de cultures a parfois été étudiée; c'est ainsi que MARINIBETTOLO et coll. (60) n'ont pas toujours trouvé de proportionnalité entre l'action fongostatique de certains colorants quinoniques et leur potentiel d'oxydo-réduction.

Nous avons donc, dans les expériences suivantes, étudié le rapport existant entre l'action sur Esch.coli de la benzoquinone et son potentiel rédox.

Le mode opératoire est le suivant: nous cultivons le colibacille dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml auxquelles nous avons fait souder un tube latéral incliné; les lectures opacimétriques se font en ~~penchant~~ la fiole pour que le liquide de culture pénètre dans le tube latéral. Nous plaçons dans chacun de ces erlens 50 ml de milieu synthétique additionné ou non de quinone seule ou associée au sulfathiazol. Aux heures indiquées nous prélevons 15 ml avec une pipette stérile et en prenant soin de ne pas agiter; on mesure aussitôt le rH puis le pH (au moment de ces lectures la température est toujours voisine de 35°). La densité optique est déterminée, après homogénéisation, sur le reste de la culture en s'aidant du tube latéral de l'erlen.

Les mesures de rH et de pH ont été effectuées avec le pHmètre HEITO et nous avons suivi dans nos mesures et nos calculs, les indications des constructeurs de l'appareil.

Tableau n° 11...

TABLEAU N° 11

Mesures du rH, du pH et de la densité optique de cultures de Esch. coli contenant l'association sulfathiazol-quinone et la quinone seule.

Concentration en quinone (x 10 ⁶)	Concentration en sulfa- thiazol (x 10 ⁶)	Valeurs du pH, du rH et de la densité optique (x 100) des cultures au bout de					
		16 heures			38 heures		
		pH	rH	D.O.	pH	rH	D.O.
6	2	7,3 6,95	24,10 22,14	3 13,5	4,8 5,2	22,40 22,37	24 29
8		7,30	24,00	3	5,1	22,40	27
10		7,40	24,50	3	7,2	25,05	4
15		7,30	24,05	3,5	7,0	23,83	4
20		7,30	24,12	4	7,2	23,48	5
6	0	5,25	26,30	28,5	4,8	21,26	34
8		5,40 7,20	25,45 21,06	30 3,5	4,8	21,26 19,67	28 23
10		6,20 7,10	23,64 22,85	31 11	4,8	20,50 19,67	29
15		7,40	22,97	3	4,95	20,12	26
20		7,40	22,45 24,14	4,5	5,5	22,91 17,65	35 30
0	2.10 ⁻⁶	5,30 5,10	12,84 12,44	28 31	4,9	21,40	34,5
Témoin		4,90	13,87	31,5	4,8	21,42	45 37

Au départ, le pH était 7,35 et le rH 22,17.

En conclusion, bien que les valeurs ne concordent pas toujours pour des cultures faites en double et contenant les mêmes concentrations de quinone et de sulfathiazol (nous avons donné dans le tableau N°11 quelques exemples de ces mesures divergentes), le développement bactérien s'accompagne d'une diminution du rH montrant qu'il y a réduction de la quinone; il y a aussi diminution du pH. Contrairement à ce que nous espérions, nous n'avons pu établir de relation entre la croissance microbienne et les variations du rH; l'acidification des milieux, même tamponnés, au cours de l'expérience et la baisse du rH lorsque *Esch.coli* prolifère sont des phénomènes bien connus. Dans la phase de croissance active la présence de quinone s'oppose à la diminution du rH, même lorsque la culture atteint une densité optique du même ordre que le témoin; ainsi lorsque la densité optique atteint environ 30 et le pH environ 5, le rH du témoin est environ 13, celui de l'erien contenant le sulfathiazol seul également, tandis que la présence de la quinone seule ou associée au sulfathiazol maintient le rH aux environs de sa valeur initiale. Le développement microbien n'est donc pas influencé par la valeur du rH, dans le cas de nos expériences tout au moins.

3°) ASSOCIATION DU SULFATHIAZOL AVEC UNE NAPHTOHYDROQUINONE SUBSTITUÉE.

Nombreux sont les dérivés des phénols et des quinones pour lesquels l'action antibactérienne a été recherchée et beaucoup d'entre eux sont très actifs. Les naphtoquinones, en raison de leur activité vitaminique K et de leur facile emploi en thérapeutique, ont été particulièrement étudiées. NASSI (65) a ainsi montré que la 1-2-naphtoquinone était aussi active que la pénicilline vis-à-vis du bacille diphtérique et que la 2-méthyl-1-4-disuccinyl-naphtoquinone, à action vitaminique K est presque aussi

active. DEL VECCHIO (87) montre que ce même corps (dont il fait à juste titre un dérivé de l'hydroquinone et non de la quinone) est bactériostatique et même bactéricide vis-à-vis de Brucella. Nous nous sommes demandé si cette propriété était générale et si de tels corps pouvaient potentialiser l'action des sulfamides. Nous avons donc essayé l'association du sulfathiazol avec un diester de la naphthoquinone; nous avons choisi le 1-4-dibenzoyl-2-méthyl-naphthohydroquinone disulfonate de sodium spécialisé sous le nom de K-Thrombyl (Roussel) qui possède des propriétés vitaminiques K et dont l'association aux sulfamides, à notre connaissance, n'avait pas encore été étudiée.

Nous donnons dans le tableau suivant le résultat d'une expérience, on voit que:

TABLEAU N° 12

Concentration en sulfathiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant le dibenzoyl-2-méthyl-naphtohydroquinone disulfonate seul (P) ou associé au sulfathiazol (SP)							
					<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
0	17	22	-	P.	23	22	21	19	19	18	17
	24	23	-	P.	24	23	22	22	22	20	19
4.10 ⁻⁶	17	-	7	SP	6	6	8	6	7	5	3
	24	-	15	SP	11	12	16	9	12	12	6
	36	-	20	SP	18	19	21	19	21	23	12
Concentration en dibenzoyl-2-méthyl-naphtohydroquinone disulfonate de sodium					10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³

le corps essayé est inactif sur Esch.coli; il n'y a pas de synergie vraie, mais seulement une tendance à favoriser l'action de la sulfamide

En résumé:

I - L'association hydroquinone-sulfathiazol est plus active que les deux constituants employés seuls.

II - a) L'association benzoquinone-sulfathiazol est également plus active que les deux constituants employés seuls.

b) L'alcalinité des mélanges sulfathiazol-hydroquinone ou quinone provoque leur brunissement à l'air; les solutions vieilles sont moins actives que les solutions récentes; Esch.coli en se développant provoque leur décoloration.

c) Esch.coli en se développant dans le milieu de culture réduit la quinone sans doute en hydroquinone.

d) Le développement microbien n'est pas clairement influencé par les variations du rH du milieu, obtenues par addition de quinone au milieu de culture.

III - Le dibenzoyl-2-méthyl-naphtohydroquinone disulfonate de sodium est sans action sur le développement de Esch. coli; ce corps ne renforce guère l'action bactériostatique du sulfathiazol.

B) ANALYSE DES MODALITÉS DE LA SYNERGIE SALICYLATE-SULFAMIDES.-

Dans ce laboratoire même, HADOT (30) avait montré combien le salicylate renforce l'action bactériostatique de la sulfanilamide, mais cet effet est beaucoup moins net in vivo qu'in vitro et aucune explication satisfaisante n'avait pu être proposée pour ces différents phénomènes. C'est pourquoi nous avons tenté d'en poursuivre l'analyse. Des travaux récents (HAHN et coll),(31) avaient attiré notre attention sur le fait que, si un médicament est capable de modifier le pouvoir antibiotique d'une sulfamide, la réciproque est également possible et la sulfamide est susceptible d'exalter la toxicité de l'agent auquel on l'associe.

Comme HAHN, nous avons pris pour test la respiration du tissu hépatique, mais, avant de l'étudier, nous avons voulu rechercher si l'association sulfamide-salicylate modifiait la respiration de Esch.coli non proliférant. Si cette respiration était modifiée davantage par l'association que par la sulfamide ou le salicylate employés seuls, nous aurions pu y voir un début d'explication de la synergie constatée. Si, au contraire, la respiration de Esch.coli n'était pas modifiée et que celle du tissu hépatique le soit, cela eût pu faire penser que l'association, trop toxique pour l'hôte, ne pouvait être employée à dose suffisante pour être efficace, d'où la faible valeur constatée pour l'association in vivo.

Enfin, connaissant l'antagonisme qui existe entre le salicylate et l'acide pantothénique, nous avons voulu voir si les effets synergiques apportés par le salicylate à l'action antibiotique de la sulfanilamide, pouvaient être levés par le pantothénate, autrement dit: est-ce que dans l'association salicylate-sulfamide les caractères propres du salicylate subsistent, ou sont-ils

dissimulés par suite peut-être d'une combinaison labile entre les deux agents?

1 - EFFETS DE LA SULFANILAMIDE, DU SALICYLATE DE SODIUM ET DE LEUR ASSOCIATION SUR LA RESPIRATION DE ESCH. COLI NON PROLIFERANT.

L'action des sulfamides sur la respiration des micro-organismes a été maintes fois étudiée; Mme POUTEAU-THOUVENOT (75) a résumé les résultats obtenus et a indiqué ceux de ses expériences sur l'association sulfanilamide-phénol. Pour distinguer l'action sur la croissance bactérienne de celle sur la respiration, nous avons pensé qu'il y aurait lieu de faire porter notre étude sur des cellules non proliférantes (resting cells). La respiration a été mesurée dans l'appareil de Warburg; la technique suivante a été employée:

a - TECHNIQUE:

Le colibacille, conservé sur gélose à la glacière, est repiqué sur milieu synthétique (voir la formule p.5) et, après 18 heures, cultivé une seconde fois sur ce même milieu. On ensemence alors 20 ml de milieu synthétique avec 0,40 ml de cette dernière culture et on hâte la croissance par agitation (70 secousses par minute). Lorsque le milieu présente une densité optique d'environ 18 (au bout de 6 heures de culture environ), on le centrifuge; les culots de centrifugation de deux essais semblables sont réunis, lavés trois fois avec une solution tampon de phosphates M/15 à pH 7,2, puis mis en suspension dans 7 ml de ce même tampon. On obtient ainsi une suspension de densité optique voisine de 95 dont on mesure 1 ml dans autant de fioles de Warburg qu'il en a été prévu pour réaliser les essais.

Dans chaque fiole, on ajoute ensuite 2 ml de liquide sans azote de PERAULT et collaborateurs (72), en employant de l'eau bidistillée; nous avons ajouté aussi des traces de sels ferreux de magnésium sous forme de

sulfate; le liquide est filtré sur papier, puis sur bougie de porcelaine. Les fioles sont alors portées dans l'appareil de Warburg réglé à la température de 37°

b - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1° ACTION DE LA SULFANILAMIDE EMPLOYÉE SEULE
PERAULT, BONNET-MAURY et coll.(72) avaient trouvé que la sulfanilamide, même à la concentration de 0,85 pour 100 (solution voisine de la saturation) ne modifiait pratiquement pas la respiration du colibacille. Avant d'étudier l'association sulfanilamide-salicylate, nous avons voulu confirmer ces résultats.

Nous avons consigné ci-dessous les résultats d'une expérience d'une durée de 120 minutes où nous avons employé la sulfanilamide à la concentration de 0,85 g pour 100.

Sulfanilamide: 554 et 610 mm³ d'O₂ consommés
Témoins : 570 et 583 mm³ " "

La sulfanilamide n'a donc pas modifié appréciablement la respiration de Esch.coli(cellules non proliférantes).

2° ACTION DU SALICYLATE EMPLOYÉ SEUL

A la concentration de 0,30 g pour 100, le salicylate s'est montré légèrement activateur de la respiration du colibacille (10 p.100)environ); les résultats obtenus dans une expérience de 110 minutes sont les suivants:

Salicylate: 528 - 529 et 552 mm³ d'O₂ consommés
Témoins : 470 et 494 mm³ d'O₂ consommés.

3° ACTION DE L'ASSOCIATION SULFANILAMIDE-SALICYLATE DE SODIUM:

Dans une première série d'expériences, nous avons maintenue constante la concentration en sulfanilamide (0,30 g p.100) et étudié la consommation d'oxygène des resting-cells en ajoutant des quantités variables de salicylate:

Concentration en salicylate(mg p.100)	30	65	300
Durée de l'expérience(en minutes)	70	120	60
Respiration d'Esch.coli(en mm3 d'O ₂)	196	548	339
en présence de l'association	203	558	392
sulfanilamide-salicylate	191	486	324
Témoins	196	566	321
	157	570	352

Dans une autre série d'expériences, la concentration en sulfanilamide a été portée à 0,85 g pour 100

Concentration en salicylate (mg pour 100)	300
Durée de l'expérience (en minutes)	90
Respiration de Esch.coli (en mm3 d'O ₂)	257
en présence de l'association	328
sulfanilamide-salicylate	345
Témoins	468
	474

Dans la première série d'expériences, l'association sulfanilamide-salicylate aux concentrations indiquées ne modifie pas sensiblement la respiration de Esch.coli non proliférant.

Au contraire, si la concentration en sulfanilamide est relativement forte, voisine de la saturation, la respiration est nettement abaissée (de l'ordre de 30 pour 100).

La sulfanilamide seule à la concentration de 0,85 g pour 100 était pratiquement sans action et le salicylate seul à la concentration 0,30 g pour 100 légèrement activateur de la respiration; la sulfanilamide a donc, dans ce cas, inversé l'effet du salicylate seul. Il faut cependant remarquer que la diminution de la respiration n'est pas considérable et n'a été obtenue qu'avec des concentrations très élevées des deux agents, concentrations qui ne sont jamais réalisées in vivo.

En résumé: le salicylate, la sulfanilamide et leur association sont sans action nette sur la respiration de Esch.coli. A de fortes concentrations cependant l'association présente des effets dépresseurs sur la respiration de Esch.coli non proliférant.

2 - ÉTUDE DE LA RESPIRATION DU TISSU HÉPATIQUE EN PRÉSENCE DE SULFANILAMIDE ET DE SALICYLATE DE SODIUM EMPLOYÉS SEULS OU ASSOCIÉS.

Comme nous l'avons rappelé p. 43, nous voulions, à la suite des travaux de HAHN et collaborateurs, nous rendre compte si la présence de sulfamides exalte la toxicité du salicylate. Dans cet ordre d'idées, dès 1939, GLAUBACH (27) avait montré que l'association de sulfapyridine à la papavérine augmente notablement la toxicité de celle-ci, rendant narcotiques ou même mortelles, des doses qui eussent paru inoffensives pour l'animal en expérience; en 1941, ce même auteur (28) généralisait ces résultats à l'action de plusieurs autres alcaloïdes. A sa suite, on a appelé "effet GLAUBACH" l'augmentation de la toxicité de certaines drogues sous l'influence des sulfamides.

ADRIANI (1) montre que le traitement préalable par les sulfamides augmente la toxicité des anesthésiques généraux pour le rat; BUTLER (13) confirme ces résultats mais ne pense cependant pas qu'ils puissent intervenir en clinique.

OELKERS et WANOWIUS (71), puis KLEINSORG et LOESER (47) reprenant cette étude, montrent que l'action potentialisant la toxicité de certains médicaments par les sulfamides n'est pas générale et ne peut être rapportée ni à une fonction chimique, ni à une propriété pharmacodynamique déterminée. DUREL et RATNER (23), à propos de l'association papavérine-sulfapyridine, posent, sans la résoudre, la question suivante: la papavérine augmente-t-elle une atteinte toxique latente due à la sulfapyridine?

MARKEES et DELOLE (58) précisent bien que c'est la molécule de sulfamide qui agit, puisque l'acide para-aminobenzoïque s'oppose à la potentialisation des effets de la papavérine par la sulfapyridine.

Tous ces résultats convergent vers la même idée: en dehors de leur action antibiotique, les sulfamides possèdent une action cellulaire. Une telle action a déjà été vue sur la cellule végétale: F.KAYSER et S.BESSON (42) et BAUCH (6). Si l'action des sulfamides sur la respiration bactérienne dépend des conditions expérimentales, Mme POUTEAU-THOUVENOT (75) ils abaissent cependant la consommation d'oxygène par les tissus in vitro.

FLEISCH, NICOD et coll.(25), VORMANN et HAHN (89) et HAHN, RUMMEL et coll.(31) font remarquer que les corps dont la toxicité est augmentée par les sulfamides sont justement ceux qui réduisent aussi la consommation d'oxygène, tels la papavérine, la procaine, la quinine, aussi ces auteurs étudient-ils l'action de l'association à base de sulfamide sur la respiration d'un tissu isolé (foie).

C'est en nous inspirant de ces considérations que nous avons comparé l'action sur le tissu hépatique de la sulfamide seule et associée au salicylate, pensant qu'une action dépressive, si elle était observée, pourrait rendre compte des différences entre l'action antibiotique in vitro et l'activité curatrice in vivo.

a - TECHNIQUE EMPLOYÉE

Nous l'avons empruntée à HAHN (31).

Dans le cas du cobaye le foie est rapidement prélevé et broyé au mortier glacé avec son poids de sable glacé. On lui ajoute alors son poids de tampon de phosphates M/15, pH8, glacé.

On triture soigneusement et on centrifuge rapidement à 1.000 tours/minute, dans un tube au préalable refroidi.

Il s'est alors écoulé au maximum 15 minutes depuis la mort de l'animal.

Nos premières expériences avaient porté sur le foie de boeuf ou de mouton; le foie nous était remis sitôt l'abattage, transporté au laboratoire dans un récipient contenant de la glace et traité comme précédemment.

Le centrifugeat est alors séparé du culot, mis dans un tube glacé puis homogénéisé par agitation. On mesure alors 1 ml de cette bouillie dans chaque fiole de Warburg préalablement glacée. Puis on ajoute à chaque fiole:

1,5 ml de tampon phosphate M/15, pH8, glacé
0,5 ml de sérum physiologique

Dans la cupule centrale de la fiole, on place 0,2 ml de solution de potasse 1/10.

La sulfamide et le salicylate sont dissous séparément et pour garder constante la quantité totale de liquide placée dans la fiole de Warburg (3,2 ml) on augmente la concentration des solutions salines et on diminue d'autant leur volume.

b - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX:

1° - ACTION DE LA SULFANILAMIDE SUR LA RESPIRATION DU BROyat DE FOIE.

Nos résultats sont consignés dans les tableaux N°13 et N°14, le premier contient ceux obtenus avec le foie de boeuf ou de mouton, le deuxième avec le foie de cobaye.

TABLEAU N° 13

a) Respiration du foie de boeuf ou de mouton en présence de sulfanilamide

Nature de l'animal	Boeuf	Boeuf	Mouton	Boeuf	Boeuf	Boeuf
Durée de l'expérience (minutes).....	90	60	90	90	90	(*) 90
Dose de sulfanilamide (mg p.100)...	40	150	300	300	300	300
Témoins (mm ³ d'O ₂ consommés).....	241,8 241,4	121,9 133,2	101,2 104,3	176,3 166,4	126,1 113,9	141 136,4
Sulfanilamide (mm ³ d'O ₂ consommés).....	216 233,2	97	70,1 69,6	137,4 132,2	99,2 99,4	126,5 130,7 111,7
(*) Même foie que le précédent, mais 3 h. après.						

Bien que ces valeurs soient irrégulières, l'impression générale qu'elles donnent est que la sulfamide est dépres-
seur de la respiration.

Pour tâcher d'obtenir des résultats plus nets, nous nous sommes adressé au foie de cobaye, animal de laboratoire dont le foie peut être mis à 0° dès que l'animal a été as-
sommé et saigné.

TABLEAU N° 14

b) Respiration du foie de cobaye en présence de sulfanilamide

		(*)			
Durée de l'expérience (en minutes).....	90	60	90	90	90
Dose de sulfanilamide (mg p. 100).....	200	200	200	300	300
Témoins (mm ³ d'O ₂ consommés).....	573,9 595,1	394,3 381,9	397,6 403,2 558,9	384,3 401,8 283,6	398,3 398 313,3
Sulfanilamide (mm ³ d'O ₂ consommés).....	772,8 772,6	550,6 532,9	577,2	335,8 313,5	362,7 293,9
(*)Expérience faite sur le même foie que précédemment, mais 3 heures plus tard.					

Les expériences sur le foie de cobaye mettent en évidence un phénomène inattendu; à la dose de 200 mg pour 100, la sulfanilamide stimule nettement la respiration (en moyenne d'un tiers), à la dose de 300 mg pour 100, elle la déprime (en moyenne d'un cinquième).

HAHN (31) avait trouvé que les sulfamides; quelle que soit leur concentration, déprimaient la respiration, mais de façon très irrégulière.

En résumé: la respiration du tissu hépatique peut être parfois déprimée parfois stimulée sous l'action des sulfamides.

Le fait avait déjà été signalé, mais par des auteurs différents, les uns parlant de l'action dépressive, les autres de l'action stimulante dans les conditions expérimentales qu'ils avaient choisies. Dans une série d'expériences faites avec un même foie et une même dose de sulfamide, les résultats obtenus dans des essais témoins concordent généralement de façon satisfaisante, de sorte que l'effet de la sulfamide sur la respiration ne peut être prévu, mais que sa mesure peut être réalisée correctement.

2° - ACTION DU SALICYLATE DE SODIUM SUR LA RESPIRATION DU BROyat DE FOIE DE COBAYE.

Les résultats que nous avons obtenus en faisant varier la concentration du salicylate dissous dans le broyat obtenu à partir du foie de cobaye (v. p.48), sont consignés dans le tableau suivant. La durée des expériences a été uniformément de 90 minutes.

Tableau N°15.....

TABLEAU N° 15

mm³ d'O₂ consommés par le broyat de foie
en présence de salicylate.

Teneur en salicylate (mg p.100)	1° expé- rience	2° expé- rience	3° expé- rience	4° expé- rience	5° expé- rience	6° expé- rience	7° expé- rience	8° expé- rience
10	400 418				(*)			
20	415	668 727						
30		226	467	150 152 164	110 123 128			
50			407					403
75			410			382 406 409		400
150							110 116 124	
Témoins	463 483	805	728 759	343 337	291 296	716 725	287 242	545
(*) Même foie que dans la 4° expérience, mais 3 heures plus tard.								

Les essais faits avec le salicylate nous ont invariablement donné une diminution de la respiration :

Pour des concentrations de salicylate de 10 et 20 mg p. 100, l'effet dépresseur est faible, de l'ordre de 15 p. 100.

Pour des concentrations échelonnées entre 30 mg et 150 mg p.100, il n'y a pas proportionnalité entre la concentration en salicylate et la dépression respiratoire qui a pu atteindre exceptionnellement 72 p.100 (expérience 5); elle est en général de l'ordre de 40 p.100.

3° - EFFETS DE L'ASSOCIATION DE LA SULFANILAMIDE AU SALICYLATE DE SODIUM SUR LA RESPIRATION DU FOIE DE COBAYE.

Nous avons associé à des concentrations croissantes de salicylate (10, 20, 30, 50 mg pour 100 g de broyat de foie) une même concentration de sulfanilamide (300 mg p.100) parce que, à ce taux, la sulfanilamide nous avait toujours donné des effets dépresseurs sur la respiration du foie. Toutes les expériences, sauf une, ont duré 90 minutes. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU N° 16

mm3 d'O₂ consommés par le broyat de foie
en présence de sulfanilamide+salicylate

	Concentration de salicylate (en mg p. 100) ajoutée à la sulfanilamide (300 mg p. 100)									
	10 mg p. 100			20mg p100		30mg p100	50 mg p. 100			
							(*)			
Association	399	378	215	406	78	304	104	178	172	152
	586	534	413	473	86					145
	601	587		460	82					120
Témoins...	426	508	471	426	172	583	146	451	488	510
	462	525	486	436	178					505

(*)Durée de l'expérience : 60 minutes.

(**)Même foie que celui de la colonne précédente, mais conservé 3 heures en glacière.

Aux concentrations de 50 et de 30 mg pour 100 le salicylate employé seul était déjà fortement inhibiteur; cette action n'est pas nettement modifiée par son association avec la sulfanilamide puisque la dépression de la respiration a été d'environ 50 %.

Aux concentrations de 20 et 10 mg pour 100 où le salicylate est moins nettement dépresseur de la respiration, son association avec la sulfanilamide donne des résultats qui ne sont pas univoques, même dans des expériences faites simultanément dans des conditions identiques: il y a parfois stimulation, parfois dépression de la respiration. C'est un résultat de cet ordre que nous avons déjà noté lorsque nous employions la sulfanilamide seule; il y a donc des cas, non prévisibles, où la sulfanilamide lève l'inhibition respiratoire que le salicylate, employé seul, n'eût pas manqué d'apporter. En tous cas l'action inhibitrice du salicylate n'est jamais notablement renforcée par la sulfanilamide.

En résumé: l'action dépressive nette du salicylate sur la respiration du broyat de foie n'est jamais renforcée par la sulfanilamide; elle est même parfois supprimée lorsque la concentration en salicylate est faible (10 et 20 mg pour 100)

3 - ACTION DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE SUR LES EFFETS
DE L'ASSOCIATION SULFAMIDE-SALICYLATE DE SODIUM.-

a) - EFFETS DE L'ASSOCIATION TRIPLE SUR LA
CROISSANCE DE ESCH.COLI.

L'antagonisme entre l'acide pantothénique et le salicylate a été mis en évidence par IVANOVICS en 1942 (38); si l'on discute sur l'importance que cette constatation peut avoir en pharmacodynamie et en thérapeutique, on est cependant d'accord sur la reproductibilité des expériences de l'auteur cité. MAAS (56), plus récemment, précise que le pantothénate à la concentration 10^{-6} M (0,022 g p.100) s'oppose à l'effet bactériostatique du salicylate à la concentration 0,014 p.100 sur le développement de Esch.Coli. MAAS indique aussi qu'un mutant de Esch.coli, qui a besoin de pantoate (produit de clivage de l'acide pantothénique), est beaucoup moins sensible au salicylate que ne l'est la souche-mère.

Pour réaliser des expériences concluantes, nous avons dû nous assurer que nous retrouvions bien les données des auteurs qui nous ont précédé: l'antagonisme du salicylate et du pantothénate, et la synergie du salicylate et du sulfamidé.

1°) Antagonisme salicylate-pantothénate: les résultats obtenus dans l'une de nos expériences sont consignés dans le tableau suivant

Tableau N°17.....

TABLEAU N° 17

Concentrations en		Densité optique (x 100) des cultures au bout de		
Pantothé- nate (*)	Salicylate	16 h.	23 h.	44 h.
3.10 ⁻⁷	10 ⁻³	13	16	16
"	5.10 ⁻⁴	24	23	24
"	10 ⁻⁴	31	31	33
"	0	32	34	36
3.10 ⁻⁶	10 ⁻³	18	23	26
"	5.10 ⁻⁴	32	36	36
"	10 ⁻⁴	43	46	43
"	0	45	45	43
3.10 ⁻⁵	10 ⁻³	26	29	31
"	5.10 ⁻⁴	36	37	40
"	10 ⁻⁴	45	47	46
"	0	42	46	46
0	10 ⁻³	16	22	24
0	5.10 ⁻⁴	29	34	33
0	10 ⁻⁴	42	43	41
Témoin		47	47	45

(*) Pantothénate de Ca Hoffmann-Laroche.

Ainsi le pantothénate aux doses indiquées est sans action sur le développement de Esch.coli; le salicylate est inhibiteur à des concentrations supérieures à 5.10⁻⁴. L'antagonisme salicylate-pantothénate est manifeste lorsque la concentration en pantothénate est égale ou supérieure à 3.10⁻⁶ et cet antagonisme est d'autant plus net que la concentration en salicylate diminue: ces résultats corroborent ceux de MAAS(56).

2°)- Synergie salicylate-sulfathiazol: l'action synergique du salicylate vis-à-vis de la sulfanilamide est manifeste (HADOT - 30); il était probable qu'elle le serait aussi vis-à-vis du Sulfathiazol. C'est ce que nous avons voulu vérifier.

Le salicylate à la concentration 5.10^{-4} permet à Esch.coli de se développer modérément: densité optique 21, en 23 heures (témoin: 40).

Le sulfathiazol, à la concentration 2.10^{-6} , donne une densité optique de 35 dans le même temps.

L'association de ces deux agents, aux mêmes concentrations, diminue bien d'avantage le développement de Esch.coli puisque la densité optique de la culture n'est que de 13 en 23 heures.

Tableau N°18.....

3° Action de l'association pantothénate, sulfathiazol, salicylate :

TABLEAU N° 18

Concentrations en			Densité optique (x 100)		
Panto- thénate	Sali- cylate	Sulfa- thiazol	des cultures au bout de		
			16 h.	23 h.	44 h.
3.10 ⁻⁷	10 ⁻³	5.10 ⁻⁶	3	4	4
"	"	2.10 ⁻⁶	4	5	5
"	5.10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶	4	5	5
"	"	2.10 ⁻⁶	5	6	6
"	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶	6	7	7
"	"	2.10 ⁻⁶	12	15	16
3.10 ⁻⁶	10 ⁻³	5.10 ⁻⁶	5	6	6
"	"	2.10 ⁻⁶	4	6	10
"	5.10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶	6	8	8
"	"	2.10 ⁻⁶	9	13	11
"	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶	7	12	24
"	"	2.10 ⁻⁶	20	20	22
3.10 ⁻⁵	10 ⁻³	5.10 ⁻⁶	5	7	9
"	"	2.10 ⁻⁶	11	22	28
"	5.10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶	7	9	14
"	"	2.10 ⁻⁶	12	22	35
"	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶	8	14	27
"	"	2.10 ⁻⁶	9	36	38
Témoin			47	47	45

Il ressort de ce tableau qu'à la concentration la plus faible de celles essayées, 3.10^{-7} , le pantothénate n'a pas modifié les effets bactériostatiques de l'association salicylate-sulfathiazol.

A la concentration 3.10^{-5} , le pantothénate est manifestement antagoniste de l'association du salicylate (aux trois concentrations employées) avec le sulfathiazol à la concentration 2.10^{-6} ; son action est moins nette dès que le sulfathiazol est plus concentré.

A la concentration intermédiaire, 3.10^{-6} , le pantothénate n'est que très partiellement inhibiteur de la bactériostase que le salicylate (à la concentration 10^{-4}) peut amener lorsqu'il est associé au sulfathiazol.

En résumé: lorsque le salicylate et le sulfathiazol sont associés aux concentrations minimum pour produire une bactériostase nette, le pantothénate à la concentration 3.10^{-5} inhibe cette bactériostase: le développement de la culture de Esch.coli reste ralenti et inférieur à celui du témoin (densité optique de 22 à 36 contre 47 pour le témoin en 23 heures).

b - EFFETS DE L'ASSOCIATION TRIPLE SUR LA RESPIRATION DU TISSU HÉPATIQUE.

Nous nous sommes d'abord assuré que l'addition de pantothénate de C_m (concentration 10^{-5}) au salicylate ne modifie pas sensiblement la respiration du broyat de foie (durée de l'expérience: 90 minutes)

Salicylate 50 mg p.100 seul: 403 mm³ d'O₂ consommés

" " " avec pantothénate: 393 mm³ " "

Salicylate 75 mg p.100 seul: 400 mm³ d'O₂ consommés

" " " avec pantothénate: 391 mm³ d'O₂ consommés

Témoin 595 mm³ d'O₂ consommés.

Dans nos premières expériences n'ayant pas de pantothénate à notre disposition, nous avons employé du

pantothénol ⁽¹⁾ (alcool correspondant à l'acide panto-
thénique). A toutes les concentrations essayées (com-
prises entre 10^{-6} et 10^{-3}) le pantothénol est sans au-
cune action sur la respiration du foie additionné du
mélange sulfanilamide salicylate.

Voici le résultat de nos expériences dans lesquel-
les des mêmes concentrations de salicylate (50 mg pour
100) et de sulfanilamide (300 mg pour 100) étaient mi-
ses en présence de concentrations variables de panto-
thénol.

1^o série d'expériences (durée 90 minutes)

L'association sulfanilamide-salicylate est addi-
tionnée de:

Pantothénol	10^{-6} ,	consommation d' O_2 correspondante	298 mm ³
Pantothénol	10^{-5} ,	consommation d' O_2 correspondante	280 mm ³
Pantothénol	10^{-4} ,	consommation d' O_2 correspondante	298 mm ³

Association sulfamide-salicylate
(sans pantothénol), consommation d' O_2 correspondante
304 mm³

Témoin " " " 589 mm³

2^o série d'expériences (durée 60 minutes)

L'association sulfanilamide-salicylate est addi-
tionnée de:

Pantothénol	10^{-4} ,	consommation d' O_2 correspondante	106 mm ³
"	5.10^{-4} ,	" " " "	89 mm ³
"	10^{-3} ,	" " " "	110 mm ³

Association sulfami-
de salicylate (sans
pantothénol) " " " " 104 mm³

Témoin " " " " 146 mm³

Les expériences suivantes ont été faites en subs-
tituant au pantothénol du pantothénate de calcium que
nous avons pu nous procurer entre temps.

(1) Pantothénol Roche.

3° série d'expériences (durée 90 minutes)

L'association sulfanilamide-salicylate est additionnée de:

Pantothénate	10^{-6}	consommation d'O ₂	correspondante	129mm ³
"	10^{-5}	"	"	158mm ³
"	10^{-4}	"	"	191mm ³
Association sulfami-				
de salicylate(sans				
pantothénate)		"	"	178mm ³
Témoin		"	"	451mm ³

4° série d'expériences (durée 90 minutes sur le même foie

que l'expérience précédente, mais conservé 3 heures à la glacière à 0°). Il s'est formé un léger précipité (peut-être du phosphate de calcium) par mélange des solutions, il n'en a pas été tenu compte.

L'association sulfanilamide-salicylate est additionnée de:

Pantothénate	10^{-3}	consommation d'O ₂	correspondante	
				101 - 102 - 146 mm ³
Association sulfami-				
de-salicylate(sans pan-				
tothénate)		"	"	172mm ³
Témoin		"	"	488mm ³

Ces expériences montrent que l'addition de pantothénate ne modifie pas sensiblement l'action dépressive de l'association sulfamide-salicylate sur la respiration du broyat de foie de cobaye.

En résumé; le pantothénate s'oppose aux effets du salicylate seul ou en association avec le sulfathiazol sur le développement de Esch.coli en milieu synthétique. Au contraire, le pantothénate agit peu sur les effets dépresseurs que présentent ces agents sur la respiration du tissu hépatique broyé; ceci laisse supposer que

le salicylate de sodium agirait plutôt par son pouvoir de complexer le fer, donc d'inhiber les cytochromes, qu'en empêchant la synthèse de l'acide pantothénique.

Conclusions du chapitre:

- 1 - La synergie des actions bactériostatiques des sulfamides et du salicylate vis-à-vis du développement de Esch.coli ne se retrouve guère dans les cellules non proliférantes de ce micro-organisme, sauf pour des concentrations élevées pour lesquelles une action dépressive a alors pu être notée.
- 2 - Le sulfathiazol n'a pas d'action régulatrice sur la respiration du tissu hépatique, le salicylate la déprime et cette action dépressive n'est jamais renforcée, elle est même parfois détruite, lorsque les deux médicaments sont associés.
- 3 - L'acide pantothénique, antagoniste de l'acide salicylique, s'oppose aux effets inhibiteurs de cette drogue employée seule ou en association avec les sulfamides, sur la croissance de Esch.coli. Pourtant l'action dépressive de l'association sulfanilamide-salicylate sur la respiration du tissu hépatique n'est pas contrebattue par addition d'acide pantothénique au milieu.

C) EFFETS DE L'ASSOCIATION DES SULFAMIDES AVEC DIFFÉRENTS INHIBITEURS D'ENZYMES ET ANTISEPTIQUES.-

Directement ou non, les sulfamides se comportent comme des inhibiteurs de processus enzymatiques. L'explication la plus satisfaisante de leur mode d'action n'est-elle pas, aujourd'hui encore, qu'elles se substituent à l'acide p-aminobenzoïque, empêchant ainsi l'élaboration d'acide folique, lequel serait coenzyme de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse d'acides aminés et de purines? Les sulfamides sont aussi des inhibiteurs très actifs de l'anhydrase carbonique et sont plus ou moins nettement inhibiteurs de certaines déshydrogénases et carboxylases.

C'est pourquoi nous avons pensé que l'association de sulfamides à des inhibiteurs d'enzymes, serait susceptible de potentialiser leur action; selon BURGI, deux corps ayant même effet pharmacodynamique et qui agissent sur des composants cellulaires différents, ont une action résultante qui peut être égale au produit des actions partielles.

Ces considérations nous ont amené à associer aux sulfamides:

- 1°) Le 2-4 dinitrophénol, inhibiteur des oxydations phosphorylantes et dont le caractère phénolique paraissait en outre prometteur, puisque plusieurs phénols potentialisent l'action des sulfamides.
- 2°) L'acide malonique, inhibiteur de la déshydrogénase-succinique, enzyme dont nous croyons que l'activité, en présence de sulfamides n'a pas encore été étudiée.
- 3°) La 8-hydroxyquinoléine et l'éthylène diamine tétracétate de sodium, agent complexant, fort employé en chimie analytique; le premier de ces corps est un antiseptique très actif, le deuxième ne l'est que faiblement; tous deux pouvant priver la cellule de métaux indispensables pourraient encore, sui-



vant la théorie de Burgi, donner lieu à des phénomènes de potentialisation de l'action des sulfamides.

- 4°) Le borate de sodium est un antiseptique médiocre; nous l'avons choisi parce que des observations publiées récemment paraissaient un peu contradictoires, l'une préconisant l'association avec les sulfamides, l'autre indiquant que le borate pouvait présenter un effet antisulfamide.

1 - ASSOCIATION DU 2-4-DINITROPHENOL AU SULFATHIAZOL.

L'association si nette du dinitrophénol sur les oxydations cellulaires a été mise en évidence par MARGNE et MAYER (57) et ce corps est depuis, sous le nom de Thermol, entré en thérapeutique courante. Les progrès récents accomplis en biochimie ont permis de préciser le mode d'action du dinitrophénol; c'est un "uncoupling agent" qui modifie le rapport des molécules d'oxygène consommées au nombre des liaisons phosphoriques riches en énergie synthétisée. JOHNSON et QUASTEL (40) mus par des considérations différentes des nôtres, ont été amenés récemment (1953) à étudier les effets de l'association dinitrophénol-sulfanilamide; ils ont montré que ce phénol n'agit pas sur le taux d'acétylation du sulfanilamide par le foie de pigeon.

Nous avons voulu voir si ces deux agents étaient synergiques dans leurs actions bactériostatiques sur *Esch.coli*, ensemencé sur milieu synthétique. Les résultats obtenus figurent dans les tableaux N°19 et 20.

Alors que les corps à fonction phénol essayés jusqu'ici se sont montrés synergiques des sulfamides, l'action du dinitrophénol est peu marquée. Il est très actif, employé seul, jusqu'à la concentration 10^{-5} et cette action n'est pas modifiée par l'addition de sulfamide. Aux dilutions plus fortes, le dinit-

TABLEAU N° 19

Concentration en sulfa-thiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant 2-4 dinitrophénol seul (P) ou associé au sulfathiazol(SP)						
					1	2	3	4	5	6
0	16	25	-	P	14	9	11	2	0	0
	24	30	-	P	15	20	18	10	0	0
	72	31	-	P	18	21	20	10	8	0
3.10 ⁻⁶	16	-	1	SP	1	1	1	1	0	0
	24	-	2	SP	10	8	2	1	1	0
	72	-	12	SP	19	17	16	2	0	0
6.10 ⁻⁶	16	-	1	SP	1	3	0	0	0	0
	24	-	2	SP	2	2	2	0	0	0
	72	-	2	SP	9	6	2	0	0	0
Concentration en dinitrophénol					10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴

trophénol n'a pas son action renforcée par celle du sulfathiazol, au contraire, il lève partiellement l'inhibition que la sulfamide est capable de produire. Ainsi le sulfathiazol, à la concentration 6.10⁻⁶ n'amène qu'une pousse insignifiante en 72 h. (densité optique 2), mais en présence de dinitrophénol, la pousse est plus nette (densité optique 9). De tels phénomènes ont déjà été mis en évidence (67) (74) (30) (75), mais celui que nous analysons ici est assez peu marqué et d'ailleurs ne se retrouve pas dans l'expérience figurant dans le tableau N°20

TABLEAU N° 20

Concen- tration en sulfa- thiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant 2-4 dinitrophénol seul (P) ou associé au sulfathiazol(SP)					
				1	2	3	4	5	
0	15	25	-	P	20	20	20	12	6
	24	25	-	P	20	21	20	11	7
2.10-6	15	-	11	SP	10	9	8	5	4
	24	-	12	SP	9	9	8	5	5
5.10-6	15	-	11	SP	8	8	7	6	4
	24	-	11	SP	8	8	7	6	6
Concentration en dinitrophénol				10-6	5.10-6	10-5	5.10-5	10-4	

En résumé l'association sulfathiazol-dinitrophénol ne présente pas de caractères nets, l'action propre de la sulfamide pouvant être tantôt légèrement augmentée, tantôt légèrement diminuée par la présence du phénolnitré.

2 - ASSOCIATION DE L'ACIDE MALONIQUE AU SULFATHIAZOL.--

Nous avons associé le sulfathiazol à l'acide malonique qui est un inhibiteur spécifique du catabolisme glucidique. Son action s'exerce principalement sur la succino-déshydrogénase, empêchant ainsi l'utilisation normale des glucides dans le cycle de KREBS.

L'action de l'acide malonique sur la cellule dépend évidemment beaucoup de sa pénétration. SLONIMSKI (82) dit qu'il n'agit pratiquement pas sur la levure intacte précisément parce que sa pénétration dans les cellules de levure est difficile. Pour AUBEL et SZULMAJSTER (5) l'acide malonique pénétrerait dans la cellule de Esch.Coli, puisque l'utilisation du

glucose est freinée de façon égale dans la cellule intacte et dans le broyat de cette bactérie, mais ces auteurs ajoutent que la concentration intracellulaire en acide malonique est certainement plus faible que celle du milieu extérieur, l'inhibition obtenue étant modérée et de l'ordre de 25 pour 100 dans les deux cas.

Le tableau ci-dessous montre l'effet de cette association sur le développement de Esch.coli

TABLEAU N° 21

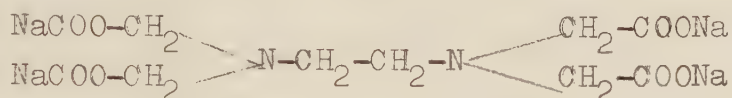
Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant acide malonique seul (P) ou associé au sulfa- thiazol (SP) à la concentration 10^{-5}							
				1	2	3	4	5	6	7
15	34	-	P	33	35	37	32	35	34	35
24	38	-	P	38	35	40	34	36	36	38
48	43	-	P	43	40	46	40	40	40	41
15	-	18	SP	15	17	18	17	17	17	18
24	-	23	SP	23	23	24	22	21	22	23
Concentration en acide malonique				10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}

Pour les concentrations employées, l'acide malonique/aussi bien seul qu'associé/
au sulfathiazol n'a aucune action sur la croissance du colibacille.

3 - ASSOCIATION D'AGENTS CHÉLATANTS AUX SULFAMIDES.- ACTION PROPRE DE CES AGENTS, SEULS OU ASSOCIÉS ENTRE EUX, SUR LE DÉVELOPPEMENT DES CULTURES DE ESCH.COLI.

Parmi les corps susceptibles de présenter sur la cellule microbienne un point d'attaque différent de celui des sulfamides (laissant donc espérer une action

synergique si on les associait à ces dernières) se trouve une catégorie de substances caractérisées par la propriété de dissimuler les métaux sous forme de complexes. On sait le rôle capital joué par certains oligo-éléments métalliques chez les êtres vivants (Fer, Cobalt...); on peut penser que les corps complexants qui chélatent ces métaux seront doués de propriétés pharmacodynamiques intéressantes. C'est ce qui nous a incité à étudier l'action de l'éthylènediamine tétracétate de sodium:



introduit récemment en chimie analytique sous le nom de complexon III, sur le développement de Esch.coli en milieu synthétique^(*) Au pH de ce milieu le complexon chélate plusieurs métaux indispensables dont Fe^{II} , Cu, Co, Zn (19).

Réciproquement le pouvoir antimicrobien reconnu depuis longtemps à la 8-hydroxyquinoléine ne pouvait-il être attribué à son pouvoir chélatant? ALBERT et coll.(2)(79) ont largement contribué à résoudre la question. Ils ont montré d'abord que, parmi les sept hydroxyquinoléines isomères, seul le dérivé 8-hydroxylé utilisé en thérapeutique sous le nom d'oxine^(xx) possédait une activité pharmacodynamique et que, seul, il était doué de la propriété de s'unir aux métaux divalents en donnant des complexes. D'ailleurs, ces deux propriétés entrent probablement en ligne de compte car, 1° l'oxine prive le micro-organisme d'un oligo-élément indispensable (Par exemple c'est en complexant le manganèse, ainsi que l'a montré GALE (26) qu'elle empêche l'assimilation de l'acide glutamique par

(*) Pour faciliter la lecture, nous emploierons souvent le terme complexon III pour désigner l'éthylènediamine tétracétate de sodium qui a été commercialisé sous les noms de versène, séquestrène, cellon E, trilon B...

(xx) Pour faciliter la lecture nous écrirons souvent oxine à l'instar des Anglo-Américains pour désigner la 8-hydroxyquinoléine.

Staphylococcus); 2° le complexe métal-oxine est doué d'une activité propre antibactérienne. Ce dernier point a été bien mis en évidence par RUBBO (79); la présence d'ions ferreux ou ~~cuivriques~~ dans le milieu est indispensable à l'action bactéricide de l'oxine. Si la concentration en oxine est relativement forte (M/800, soit 0,018 g pour 100), son action antiseptique disparaît; elle reparaît si on ajoute Fe^{++} au milieu et il faut, au moins, 4 Fe^{++} par molécule d'oxine pour que celle-ci puisse présenter un pouvoir bactéricide net (ALBERT (2). De même ANDERSON et SWABY (3) ont montré que le cuivre est nécessaire à l'action de l'oxine et ROTH, SORKIN et coll.(78) que l'augmentation de la teneur en cuivre renforce, jusqu'à un certain point, l'action de l'oxine. L'activité antibactérienne de l'oxine dépend, en effet, de la proportion de molécules d'oxine et d'ions métalliques mis en présence. C'est ainsi qu'ALBERT (2) a montré qu'il y a deux sortes de complexes oxine-fer:



Seul le premier de ces complexes serait toxique pour la bactérie car il n'est pas saturé et il est liposoluble et la liposolubilité semble conditionner le pouvoir antimicrobien.

En chimie biologique on a signalé les propriétés inhibitrices du complexon III vis-à-vis de certains enzymes possédant des métaux pour co-ferment (acide ascorbique oxydase, succinoxydase). On a montré que les êtres supérieurs peuvent recevoir sans dommage de fortes quantités de complexon et que celui-ci peut être employé pour dissoudre certains calculs, pour hâter l'élimination du plomb dans l'intoxication saturnine, comme anticoagulant, et en tant qu'antioxygène comme protecteur de certaines denrées alimentaires. Le complexon III ne serait pas métabolisé par les micro-organismes

et, contrairement à ce qui a été dit pour l'oxine, son action bactériostatique n'a pas été systématiquement étudiée.

Nous étudierons successivement les effets de l'oxine associée à une sulfamide, et enfin ceux de l'association oxine-complexon

a) ASSOCIATION OXINE-SULFATHIAZOL:

Nous avons d'abord établi quelle était la dose minima de l'oxine qui, dans nos conditions expérimentales (v.p.9) se montrerait nettement antibactérienne: Aux concentrations supérieures au cent millième (10^{-5}), l'oxine empêche tout développement de Esch.coli, au moins pendant 70 heures.

L'association du sulfathiazol, à la concentration 4.10^{-6} à l'oxine ne modifie pas son action antibactérienne. Employée à des concentrations moindres, l'oxine n'a plus de pouvoir bactériostatique net et elle ne renforce pas l'action propre du sulfathiazol (voir tableau N°22).

TABLEAU N° 22

Concentration en sulfathiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant oxine seule (P) ou associée au sulfathiazol (SP)					
				1	2	3	4	5	
0	17	36	-	P	29	33	34	26	26
	24	41	-	P	37	36	38	34	38
10-6	17	-	33	SP	21	28	27	30	8
	24	-	42	SP	43	39	40	41	37
2.10-6	17	-	12	SP	14	15	13	16	7
	24	-	23	SP	25	25	24	27	17
Concentration en oxine				10-7	5.10-7	7.10-7	10-6	5.10-6	

Si l'action antibactérienne de l'oxine reconnaît bien le mécanisme proposé -formation de complexes toxiques ou inutilisables pour l'organisme, avec des métaux indispensables-, cette action devrait être aussi nette quand on l'essaie sur une culture en cours de développement. C'est ce que nous avons vérifié (voir tableau N°23): si l'antiseptique est ajouté au milieu de culture lorsque le développement microbien est déjà notable (densité optique 5 ou 10 suivant les expériences), la bactériostase est totale dès que la concentration en oxine atteint 10^{-4} . Or on sait que les sulfamides sont inactives lorsqu'on les incorpore dans une culture dont le développement est déjà en cours. Nous nous sommes demandé si, dans ces conditions, la présence de sulfathiazol à une concentration faiblement inhibitrice par elle-même (2.10^{-6}) modifierait l'action de l'oxine; les résultats consignés dans le tableau suivant montrent qu'il n'en est rien.

Tableau N°23.....

TABLEAU N° 23

Concentration en sulfa- thiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant l'oxine seule (P) ou associée au sulfathiazol (SP)				
				1	2	3	4	
1° Addition d'oxine, de sulfathiazol et de leur asso- ciation lorsque le densité optique des cultures est de 5 environ (cette valeur est déduite des chiffres ci-dessous).								
0	3	5	-	P	8	7	0	0
	5	21	-	P	19	19	0	0
	6	25	-	P	30	19	0	0
	18	32	-	P	37	27	0	0
2.10 ⁻⁶	3	-	8	SP	8	7	0	0
	5	-	20	SP	18	17	0	0
	6	-	25	SP	25	21	0	0
	18	-	30	SP	32	28	0	0
2° Addition d'oxine, de sulfathiazol et de leur asso- ciation lorsque la densité optique des cultures est 10 environ (cette valeur est déduite des chiffres ci-dessus).								
0	2	11	-	P	7	8	0	0
	3	15	-	P	20	21	0	0
	15	32	-	P	30	32	0	0
2.10 ⁻⁶	2	-	8	SP	7	7	0	0
	3	-	18	SP	19	19	0	0
	15	-	30	SP	30	28	0	0
Concentration en oxine				10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	

En résumé, la présence de sulfathiazol ne modifie pas nettement les caractères de l'action antibactérienne que possède l'oxine.

Les différences d'action des drogues sont parfois si grandes, lorsqu'on compare les effets obtenus sur les micro-organismes à ceux obtenus sur les animaux de laboratoire que: malgré les résultats peu encourageants apportés par notre étude *in vitro*, nous avons voulu chercher si l'association sulfamide-oxine ne serait pas plus efficace, *in vivo*, que chacun des agents employés seuls.

Nos essais ont porté sur la souris, infectée par *Salmonella typhi murium*, germe qui se comporte, vis-à-vis des sulfamides, sensiblement comme *Esch.coli*(30). Des expériences préliminaires nous ont permis d'établir la concentration de la suspension de germes qui, par injection intrapéritonéale d'un volume de 0,2 ml, amène la mort de l'animal en 24 à 48 heures. D'autres essais nous ont montré les doses d'oxine et de sulfathiazol qui, seules ou associées, sont bien supportées par l'animal sain. L'oxine seule à la dose du mg amène la mort de la souris en 5 minutes, avec convulsions. Aussi nous sommes-nous limité à l'emploi de doses d'un et de deux dixièmes de mg.

Pour juger des effets de ces agents sur l'animal infecté, nous avons utilisé quatre lots de trois souris chacun, les animaux pesant tous environ 20 mg.

Le premier lot a été injecté avec la suspension de *S.typhi murium* et mes animaux sont tous morts entre la 23^e et la 28^e heure.

Les souris composant le deuxième et le troisième lots ont reçu, en même temps que *S.typhi murium* une injection soit de 0,2 mg d'oxine (2^e lot), soit de 2 mg de sulfathiazol (3^e lot). Tous les animaux composant ces lots sont morts en moins de 46 heures.

Les souris du dernier lot ont reçu l'association sulfathiazol-oxine (aux doses ci-dessus indiquées) en

même temps que l'injection infectante. Ils sont tous morts en 46 heures.

L'association nous paraît cependant n'avoir pas été sans présenter un léger avantage: aucun des animaux qui composaient le dernier lot, n'est mort au cours des 28 premières heures, alors que 2 animaux du 2^o lot et 1 du troisième étaient morts à ce moment là.

Ainsi les deux agents essayés retardent les progrès de l'infection, et leur association a été nettement plus active dans ce sens que chacun d'eux employé seul.

Il est probable que des expériences analogues aux nôtres ont dû être faites sans donner de résultats plus favorables car nous avons trouvé dans la littérature scientifique un article de BONTEMPS (10) consacré exclusivement à la détermination analytique des doses des constituants d'un mélange de sulfanilamide et de 8-hydroxyquinoléine. Un tel mélange se retrouve dans certains suppositoires (Rectoseptal des laboratoires Dérol).

b) ASSOCIATION COMPLEXON III.- SULFATHIAZOL:

Nos expériences (tableau N°24) ont mis nettement en évidence que le complexon, employé seul, présente une action bactériostatique nette, mais pas très forte, sur le développement de Esch.coli, en milieu synthétique, dès que la concentration en drogue dépasse 10^{-4} .

L'addition de sulfathiazol, à la concentration 2.10^{-6} , inactive par elle-même, renforce l'action bactériostatique du complexon III puisque, même au bout de 72 heures, la croissance bactérienne reste presque nulle.

TABLEAU N° 24

Concen- tration en sulfa- thiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant le complexon seul (P) ou associé au sulfathiazol (SP)							
				1	2	3	4	5	6	7	
0	16	34	-	P	31	33	31	30	8	10	8
	24	35	-	P	31	36	36	30	18	11	8
	48	37	-	P	33	38	35	30	18	11	9
2.10 ⁻⁶	16	-	26	SP	25	18	19	14	8	2	2
	24	-	29	SP	25	22	19	17	10	2	2
	48	-	30	SP	28	19	19	21	13	3	3
	72	-	37	SP	37	36	35	36	37	3	3
5.10 ⁻⁶	16	-	13	SP	12	12	12	10	9	3	2
	24	-	17	SP	14	13	17	11	11	3	2
	48	-	17	SP	15	15	18	13	12	4	2
	72	-	35	SP	36	35	34	33	34	4	2
Concentration en complexon				10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³	

Ainsi, le sulfathiazol ne modifie pas les effets de l'oxine, il renforce ceux du complexon, ce qui laisse supposer que ces deux agents complexants n'agissent pas par les mêmes mécanismes pour empêcher la prolifération bactérienne.

c) ASSOCIATION OXINE-COMPLEXON III:

Les essais qui viennent d'être rapportés tendent à montrer que les modes d'action de ces deux agents chélatants sont sans doute différents, c'est pourquoi leur association aurait pu présenter des phénomènes d'antagonisme ou de synergie qu'il nous a paru intéressant de chercher à mettre en évidence.

Une étude analogue a été entreprise par FEENEY (24) dans le cas de l'association de l'oxine avec une albumine isolée du blanc d'oeuf, la conalbumine; des phénomènes de levée d'inhibition ont été constatés et une explication théorique, que nous citerons dans la discussion, a été proposée.

Nos résultats expérimentaux sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 25

Concen- tration en oxine	Densité optique (x 100) des tubes contenant le complexon, l'oxine ou leur association, après 16 heures.					
	1	2	3	4	5	6
10^{-7}		38	38	36		
10^{-6}	39	39	38	28	4	3
10^{-5}	0	32	36	19	0	1
10^{-4}	0	0	0	13	0	0
0 (témoin)	38	36	40	4		
Concentration en complexon	0	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	5.10^{-4}	10^{-3}

Ils montrent que lorsque l'un des agents est employé à concentration relativement élevée, son association avec l'autre agent ne modifie pas le résultat et l'action antibactérienne reste inchangée. Les résultats sont plus curieux lorsque les concentrations employées sont au voisinage du seuil de l'action.

L'oxine, comme le complexon, lorsqu'ils sont essayés seuls, à la concentration 10^{-4} , sont l'un et l'autre antibactériens; l'association de ces deux agents n'est qu'irrégulièrement bactériostatique et la valeur 13 indiquée dans le tableau est une moyenne entre des chiffres très variables. Nous imputons l'irrégularité de ces résultats à la teneur, sans doute très variable, de nos tubes de cultures en traces de métaux actifs.

D'autre part, l'inhibition apportée par le complexon à la concentration 10^{-4} peut être levée par la présence de l'oxine à la concentration 10^{-6} , inactive

par elle-même.

Discussion: Ainsi, aux concentrations voisines du seuil d'action, l'association des deux agents complexants peut aboutir à la levée de l'inhibition du développement que chacun, pris isolément, aurait provoquée. Un résultat analogue avait déjà été observé par FEENEY(24), par association de l'oxine avec la conalbumine, qui est aussi une molécule capable de dissimuler les ions métalliques. FEENEY a proposé l'explication suivante: l'un des complexants présente une affinité plus grande pour les ions ferreux, l'autre pour les ions cobalteux. Le mélange des deux agents cesse d'être actif parce que les deux métaux catalytiques étant complexés en même temps, il n'y a plus prédominance de l'un sur l'autre et ce serait justement la prédominance de l'un d'eux qui provoquerait la bactériostase. En effet, si on ajoute des ions ferreux seuls, ou des ions cobalteux seuls, au milieu de culture contenant les deux agents chélatants, l'inhibition bactérienne s'obtient de nouveau.

Nous avons voulu voir si l'hypothèse proposée par FEENEY pouvait se transposer dans le cas que nous étudions (association oxine-complexon). Pour cela, nous avons d'abord ajouté du sulfate ferreux ammoniacal (sel de Mohr) à une culture de *Esch. coli*, en milieu synthétique contenant déjà de l'oxine; la concentration en Fe^{++} était 10^{-5} , dose supérieure à celle qui pouvait être complexée par l'oxine. Conformément aux données de RUBBO (79) le fer lève l'inhibition apportée par l'oxine sur les bacilles à Gram-: en 15 heures, la densité optique de la culture était de 39 en présence de Fe^{++} alors qu'elle n'était que de 5 dans le milieu ayant reçu l'oxine (10^{-5}) sans addition d'ions ferreux.

L'association du complexon avec les ions ferreux nous a donné des résultats analogues; à la concentration 10^{-5} , Fe^{++} lève l'inhibition que le complexon

provoque dès que sa concentration atteint 10^{-4} .

Lorsque oxine et complexon sont associés à des concentrations voisines du seuil de l'action bactériostatique, mais actives par elles-mêmes et en mélanges (respectivement 10^{-5} et 10^{-4}), l'addition d'ions ferreux au mélange (10^{-6} ou 10^{-5}), lève totalement l'inhibition et la densité optique obtenue en 15 heures est sensiblement celle que présente une culture de *Esch. Coli*, en milieu synthétique, sans aucune addition. Il ne nous semble pas nécessaire de faire intervenir la notion de différences d'affinité de l'oxine et du complexon pour les métaux pour expliquer les résultats que nous venons de rapporter. Une telle différence d'affinité a cependant été notée par nous et nous avons pu montrer, in vitro, que le complexon déplace Fe^{++} engagé dans un complexe oxine-fer, ce dernier étant insoluble alors que le premier est soluble dans l'eau.

En résumé, l'oxine très active par elle-même ne voit pas son activité antibactérienne modifiée de façon sensible par association avec une sulfamide.

Le complexon III n'est bactériostatique que pour des concentrations supérieures à 10^{-4} ; son association avec le sulfathiazol renforce notablement le pouvoir inhibiteur.

L'association de l'oxine avec le complexon ne modifie le pouvoir antibactérien de ces agents, pris isolément, qu'aux doses à peine supérieures à leurs seuils d'action; on note alors fréquemment une levée d'inhibition. Ces résultats sont discutés en fonction de l'hypothèse de FEENEY(24).

4 - ASSOCIATION DE L'ACIDE BORIQUE (OU DU BORATE DE SODIUM) AU SULFATHIAZOL.

L'association borate-sulfamide a été parfois préconisée en thérapeutique, soit qu'une synergie ait été espérée soit que plutôt on ait voulu profiter du pouvoir tampon du borate pour pouvoir utiliser des solutions concentrées de sulfamides sans être gêné par leur alcalinité. KOSTENBAUDER (48) a ainsi montré l'avantage de l'association sel de sodium du sulfathiazol-borate dans les collyres. Une solution borate de sodium-acide borique à pH 8,8 additionnée de 5 pour 100 de sulfathiazol (sel de sodium), voit à peine augmenter son pH, il passe à 8,93.

Cependant BIGGER (9), dans une large étude du synergisme et de l'antagonisme des antibiotiques a montré que l'acide borique était antagoniste du sulfathiazol. Dans les conditions expérimentales de BIGGER, le sulfathiazol à la concentration 4.10^{-5} produit une bactériostase qui est encore totale à la vingt-deuxième heure; en présence de 0,12 à 0,25 g d'acide borique pour 100 g de milieu (concentrations non inhibitrices par elles-mêmes) un notable développement bactérien se produit au contraire.

Nous avons opéré nos essais successivement avec du tétraborate de sodium et avec de l'acide borique (voir tableaux N°26 et N°27). Sauf aux fortes concentrations en borate qui sont inhibitrices par elles-mêmes, l'association de ces corps au sulfathiazol aux concentrations indiquées ne modifie pas sensiblement l'action antibactérienne de la sulfamide; pour certaines concentrations un certain antagonisme a pu être mis en évidence, mais il est bien moins net que celui indiqué par BIGGER, il doit cependant rendre prudent dans l'emploi éventuel des associations sulfamide-borate en clinique.

TABLEAU N° 26

Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant l'association sulfathiazol-tétraborate de sodium (SP)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration en sulfathiazol $2 \cdot 10^{-6}$											
14	20	8 SP	3	3	2	4	3	3	2	2	2
24	21	19 SP	14	11	12	18	16	11	14	5	6
48	32	20 SP	16	16	18	22	21	26	23	26	7
Concentration en sulfathiazol $3 \cdot 10^{-6}$											
14	28	1 SP	0	2	1	0	4	0	1	1	0
24	31	2 SP	1	2	1	6	4	1	2	1	0
48	40	20 SP	20	18	19	22	21	27	24	24	5
Concentration en borate			10^{-6}	$3 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$3 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$3 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}

TABLEAU N° 27

Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant acide borique seul (P) ou associé au sulfathiazol (SP)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration en sulfathiazol 0											
15	37	- P	39	40	39	38	36	36	35	2	2
24	39	- P	37	37	37	38	36	35	35	4	2
40	44	- P	44	44	44	44	41	40	39	7	2
72	46	- P	47	47	46	47	44	44	44	12	3
Concentration en sulfathiazol $3 \cdot 10^{-6}$											
15	-	24 SP	20	20	21	20	21	23	23	3	1
24	-	26 SP	28	26	24	24	24	26	28	5	2
40	-	28 SP	28	28	28	29	26	30	35	16	2
72	-	32 SP	30	30	29	28	29	34	36	27	2
Concentration en sulfathiazol $6 \cdot 10^{-6}$											
15	-	12 SP	11	11	13	12	12	15	13	4	1
24	-	16 SP	14	16	19	14	17	20	20	6	2
40	-	16 SP	14	15	17	18	19	22	23	25	2
72	-	19 SP	17	16	19	20	21	25	24	25	2
Concentration en			10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}
acide borique											

D - ASSOCIATION DU SULFATHIAZOL AVEC DES CORPS SUSCEPTIBLES
DE PRÉSENTER DES PROPRIÉTÉS ANTISULFAMIDES.

Les associations de sulfamides avec les trois corps groupés dans ce chapitre, ainsi que celle avec l'acide borique étudiée dans le chapitre précédent, ont été essayées par nous dans l'esprit de voir si nous retrouverions, dans nos conditions expérimentales, les résultats annoncés récemment par des auteurs étrangers (voir p.82 et suivantes).

Il a été écrit que l'acide p-aminohippurique possède un pouvoir antisulfamide très faible; cela est-il dû à une hydrolyse qui pourrait se faire à l'intérieur des cellules du micro-organisme et qui ferait apparaître de l'acide p-aminobenzoïque; ne serait-ce pas plutôt imputable à la présence de traces de PAB qui souilleraient le produit commercial?

Le pouvoir antisulfamide signalé pour la rutine, de façon inconstante d'ailleurs, nous paraissait inexplicable et nous souhaitions vérifier si nous le décelerions aussi dans nos expériences.

Plus surprenante encore nous paraissait l'affirmation selon laquelle la glutamine serait synergique de l'action bactéricide des sulfamides; n'ayant pu tout d'abord nous en procurer, nous avons étudié aussi les associations à base d'acide glutamique et d'asparagine, corps qui présentent tous deux une grande parenté chimique avec la glutamine. Aucune de ces trois substances n'a modifié de façon appréciable l'action du sulfathiazol sur le développement de Esch.coli en milieu synthétique.

1 - ASSOCIATION DE L'ACIDE PARAMINOHIPPURIQUE
AVEC LE SULFATHIAZOL.

L'acide p-aminohippurique (PAH) peut être considéré comme une molécule chimiquement très voisine de l'acide p-aminobenzoïque (PAB), l'antisulfamide type. On pouvait se demander, à priori, si PAH se comporterait comme PAB ou si, au contraire, en raison de sa formule de structure, il agirait comme anti-PAB et, dans ce cas, s'il serait synergique des sulfamides.

Le comportement vis-à-vis des sulfamides de nombreux dérivés de PAB a déjà été étudié; certains d'entre eux, tel la procaine qui est un ester diéthylaminoéthanolique de PAB, agissent comme PAB parce qu'ils libèrent cette molécule in vivo; PAH serait-il aussi une source de PAB chez certains êtres vivants.

Il paraissait en effet plausible que l'organisme vivant, capable de transformer l'acide benzoïque en acide hippurique, puisse aussi transformer PAB en PAH et, éventuellement, que la dégradation de PAH en PAB puisse également avoir lieu. Les questions que nous nous posions à ce sujet et auxquelles nous sommes parvenu à donner réponse dans le cas de Esch.coli (PAH n'est pas transformé en PAB et ne possède pas d'action propre sur la bactériostase sulfamidique) ont été étudiées tout récemment dans d'autres laboratoires, mais nous n'en avons connu les résultats qu'après l'achèvement de notre travail expérimental. KIELLEY (44) a montré que le foie isolé du rat est capable de transformer PAB en PAH par amidification à l'aide du glycocole; CHANTRENNE(15) a précisé que l'enzyme est localisé dans les mitochondries et n'agit qu'en présence de coenzyme A (et sans doute de ATP si les résultats trouvés pour la transformation de l'acide benzoïque en acide hippurique sont extrapolables au cas de PAH).

RIGGS et CHRISTENSEN (76) ont mis en évidence que l'administration de PAH aussi bien que de PAB, faite au rat, permet de retrouver dans l'urine ces deux corps et leurs dérivés acétylés, montrant ainsi que le retour de PAH à PAB est possible chez le rat.

Enfin, MORVILLO et GARATTINI (63) ont établi que PAH n'était antagoniste de la sulfanilamide en milieu synthétique de Koser que pour des concentrations relativement élevées comprises entre 5 et 100.10^{-6} , ces auteurs considèrent alors cette action de PAH comme négligeable puisque dans des expériences comparatives PAB s'est montré antisulfamide à des concentrations variant entre 10^{-6} et 10^{-8} .

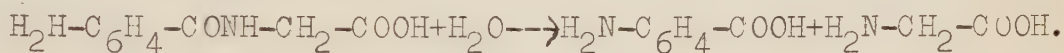
Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'action de doses croissantes de PAH allant de 10^{-6} à 10^{-3} , en association avec le sulfathiazol à la concentration 5.10^{-6} .

TABLEAU N° 28

Concentration en sulfa- thiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes con- tenant PAH seul (P) ou associé au sulfathiazol (SP)							
				1	2	3	4	5	6	7	
0	13	25	-	P	23	21	23	23	23	23	22
	37	21	-	P	20	20	22	20	21	21	21
	62	23	-	P	24	25	26	22	21	22	21
5.10 ⁻⁶	13	-	6	SP	8	6	5	5	6	12	18
	37	-	8	SP	8	8	9	8	11	16	18
	62	-	11	SP	11	10	10	9	11	14	15
Concentration en PAH				10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³	

Nos résultats consignés dans le tableau ci-dessus montrent que, jusqu'à la concentration 10^{-4} , PAH ne modifie pas appréciablement l'action de la sulfamide. Si la concentration en PAH est encore augmentée (5.10^{-4} à 10^{-3}) (1) il apparaît alors un certain antagonisme avec la sulfamide dont l'action bactériostatique est presque totalement levée.

Nous avons pensé qu'une action antisulfamide obtenue seulement pour de si fortes concentrations de PAH ne devait pas être attribuée à cette molécule elle-même et nous avons émis l'hypothèse (dont les travaux de RIGGS étayaient la vraisemblance) que Esch.coli était susceptible de décomposer partiellement PAH en PAB suivant la réaction:



Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cultivé Esch.coli sur PAH, filtré la culture, ajouté une sulfamide; si Esch.coli avait libéré PAB aux dépens de PAH, la sulfamide ne devrait plus présenter d'effet bactériostatique. Tel n'a pas été le cas.

Voici le mode opératoire que nous avons suivi: Nous avons ensemencé des tubes contenant du milieu synthétique additionné de PAH aux concentrations 10^{-4} et 10^{-3} avec du colibacille.

Lorsque la densité optique a atteint environ 20 (après 7 à 8 heures de culture), nous avons centrifugé, puis le pH étant ramené à 7,2 par addition de soude normale (environ 0,2 ml par 10 ml) ajouté 0,05 g de glucose par tube (pour compenser le glucose catabolisé pendant la croissance microbienne) et enfin filtré

(1) Les chiffres de MORVILLO et GARATTINI rapportés ci-avant sont valables pour la sulfanilamide, les nôtres pour le sulfathiazol; on voit qu'ils sont du même ordre de grandeur puisque le sulfathiazol est plus actif que la sulfanilamide vis-à-vis de Esch.coli.

sur bougie.

Nous avons ensemencé à nouveau ces tubes avec du *Colibacille* et ajouté du sulfathiazol de façon à réaliser la concentration 5.10^{-6} . Les résultats consignés dans le tableau N°29 ci-dessous sont identiques à ceux de la première série d'expériences: PAH à la concentration 10^{-4} est sans action, à la concentration 10^{-3} il est antisulfamide. *Esch.coli* n'a donc pas libéré d'antisulfamide à partir de PAH.

TABEAU N° 29

Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant PAH (ayant subi un contact préalable avec <i>Esch. coli</i>), associé au sulfathiazol à la concentration 5.10^{-6}	
14	18	5	7	15
24	20	6	7	20
38	21	7	7	22
Concentration en PAH			10^{-4}	10^{-3}

Nous avons alors émis une seconde hypothèse. Le PAH que nous utilisions n'était pas absolument pur et contenait des traces de PAB. Une telle hypothèse avait déjà été formulée par LAMPEN (49); pour la vérifier nous avons cherché à éliminer PAB de PAH par agitation pendant plusieurs heures avec de l'éther, qui est un bon solvant de PAB et ne dissout pratiquement pas PAH. Tantôt PAH, ainsi purifié, perdait la propriété de lever l'inhibition de la sulfamide au bénéfice de l'extrait sec de la solution étherée ayant servi à la purification, tantôt cette propriété était

conservée en dépit du traitement par l'éther.

Le dosage chimique de PAB dans PAH suivant la méthode de COHEN et MacGILVERY(17) quoique très sensible, ne nous a pas paru suffisant pour détecter des traces de PAB comme celles auxquelles nous pensions avoir affaire et comme finalement c'est l'activité biologique de PAB qui nous intéressait ici, nous avons préféré nous adresser à la méthode microbiologique.

Nous avons pu nous procurer une souche de colibacille mutant qui nécessite PAB comme facteur de croissance⁽¹⁾ L'emploi du mutant a montré:

- 1 - Que PAH employé contenait effectivement PAB ou un corps se comportant comme PAB vis-à-vis du mutant.
- 2 - Que la purification par l'éther n'éliminait qu'une partie de PAB.

Nous avons cherché à apprécier quantitativement l'antisulfamide contenu dans PAH et nous avons montré que PAB permet la croissance du mutant PAB (-) pour des concentrations supérieures à 10^{-9} (début de développement); PAH joue le même rôle à des concentrations supérieures à 5.10^{-7} . Le rapport d'activité est donc $5.10^{-7}/10^{-9}=500$ et notre produit commercial contiendrait l'équivalent de 0,2 g pour 100 g de PAB. On comprend alors qu'une concentration de 5.10^{-4} de PAH équivalant à une concentration de 10^{-6} de PAB apportée sous forme d'impureté, puisse lever l'inhibition due au sulfathiazol.

(1) Ce mutant PAB (-) nous a été fourni par l'"AMERICAN TYPE COLLECTION" et porte l'indicatif N°9723 a.

En résumé: PAH est antisulfamide mais seulement à des concentrations élevées, de l'ordre du millième. Cette propriété n'est imputable ni à PAH lui-même, ni à une transformation chimique de la molécule. Le pouvoir antisulfamide de PAH est dû aux traces de PAB de l'ordre de 2 p. 1.000 contenues à l'état d'impureté dans le produit commercial (ou à un corps antisulfamide se comportant comme PAB vis-à-vis du mutant PAB(-)).

2 - ASSOCIATION DE LA ROUTINE AVEC LE SULFATHIAZOL:

De même qu'une sulfamide peut augmenter la toxicité du médicament auquel on l'associe (effet GLAUBACH, v.p.47) de même, pouvait-on penser : une sulfamide pourrait s'opposer à l'effet curatif de certains médicaments. C'est ainsi que les cliniciens, comme le rappelle HEIN (33), ont constaté qu'un traitement sulfamidé fait réapparaître les hémorragies que la routine avait supprimées. HEIN s'est demandé si la réciproque était vraie: si la routine ne serait pas antagoniste des sulfamides.

Le fait que des vitamines -et la routine est une vitamine P- soient antagonistes des sulfamides n'est pas surprenant puisqu'elles apportent au micro-organisme des ressources nouvelles pour lutter contre la sulfamide. L'antisulfamide type qu'est l'acide p-aminobenzoïque n'est-il pas une vitamine? Pourtant d'autres vitamines sont sans action nette sur la bactériostase sulfamidique; ainsi l'acide ascorbique, la thiamine, la riboflavine étudiées par HADOT; la cobalamine, l'acide pantothénique, un dérivé de la naphtoquinone, étudiés par nous-même, (v.p. 106, 102, 40).

Pour HEIN (33), la routine se comporte effectivement en antisulfamide vis-à-vis de plusieurs espèces microbiennes, mais la règle n'est pas générale et les effets dépendent de la nature de la sulfamide et non seulement de l'espèce, mais même de la souche du micro-organisme en expérience.

Ce phénomène d'antagonisme rutine-sulfamide aurait pu être attribué à l'oxydation reversible que peut présenter la rutine (33), mais nos expériences sur la quinone et l'hydroquinone nous font rejeter cette hypothèse; comme beaucoup d'auteurs nous pensons que le rH du milieu est sans rapport direct avec l'action antibiotique des sulfamides. HEIN pense que la rutine diminue la perméabilité des bactéries aux sulfamides, hypothèse qui, à priori, nous paraît plus satisfaisante. Nous avons voulu voir si dans nos conditions expérimentales habituelles l'antagonisme signalé se produit. Nous avons employé un dérivé soluble de la rutine, la solurutine Dausse qui est une morpho-lyléthylrutine, la rutine étant elle-même un glucoside d'une flavone.

TABLEAU N° 30

Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant la morpho-lyléthylrutine seule (P) ou associée au sulfathiazol (SP) à la concentration 10 ⁻⁵									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Première expérience.												
16	9	-	P	10	10	8	7	10	9	8	9	11
24	42	-	P	23	29	33	32	31	28	35	25	27
40	43	-	P	41	33	36	46	41	35	42	38	40
16	-	8	SP	6	7	10	7	8	8	8	9	12
24	-	9	SP	8	8	9	10	10	10	10	11	14
40	-	11	SP	10	10	11	11	12	11	11	13	16
Seconde expérience.												
16	20	-	P	13	15	19	10	16	15	5	18	17
24	20	-	P	19	12	16	17	18	19	19	18	19
40	20	-	P	19	19	19	17	18	18	20	20	20
16	-	7	SP	3	3	3	3	3	2	4	5	5
24	-	7	SP	5	3	3	3	4	3	5	6	6
40	-	8	SP	6	4	3	3	4	4	5	6	7
Concentration en solurutine				10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³	5.10 ⁻³	10 ⁻²

Les expériences consignées dans le tableau précédent montrent que la solurutine employée seule n'a pas d'action nette sur la croissance de Esch.coli. L'association de sulfathiazol à une large marge de concentrations de solurutine a donné une très légère diminution de l'activité antibiotique dans la première série d'expériences et au contraire une très légère augmentation de celle-ci dans la seconde série d'expériences.

Au total la rutine, employée seule ou en association avec le sulfathiazol est sans action nette sur le développement de Esch.coli. Nos résultats s'opposent donc à ceux purement qualitatifs de HEIN qui avait d'ailleurs employé une autre sulfamide que nous, une autre rutine soluble (Rutinon) et d'autres souches de Esch.coli.

3 - ASSOCIATION DE LA GLUTAMINE, DE L'ASPARAGINE OU DE L'ACIDE GLUTAMIQUE AVEC LE SULFATHIAZOL.

Faisant systématiquement la bibliographie de ce qui concerne les sulfamides, nous avons lu que WARE(90) signalait une potentialisation de ces médicaments par la glutamine. Cela nous a paru surprenant puisque la glutamine n'a sans doute aucune action propre et que les acides aminés et leurs dérivés sont plutôt anti-sulfamides que le contraire. C'est pourquoi nous avons pensé qu'il serait intéressant de reprendre les expériences de WARE.

N'ayant pas eu tout d'abord de glutamine à notre disposition, nous avons étudié les associations à base d'acide glutamique ou d'asparagine; le premier de ces corps ne diffère de la glutamine que par une fonction amide et le deuxième en est l'homologue inférieur. L'acide glutamique était d'ailleurs intéressant à étudier puisqu'il entre, à côté de PAB, dans la molécule d'acide folique.

Les tableaux N°31 et N°32 montrent que l'acide glutamique et l'asparagine, employés seuls, sont sans action sur la croissance de Esch.coli; associés au sulfathiazol, aux concentrations indiquées, ils ne modifient pas l'action bactériostatique de ce sulfamidé, tout au plus peut-on noter, dans le cas de l'acide glutamique, une légère action anti-sulfamide.

TABLEAU N° 31

Concentration en sulfathiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant acide glutamique seul (P) ou associé au sulfathiazol (SP)							
				1	2	3	4	5	6	7	
0	16	21	-	P	21	20	21	23	22	24	27
	48	26	-	P	26	26	27	29	29	28	29
2.10 ⁻⁶	16	-	18	SP	25	25	26	28	26	26	31
5.10 ⁻⁶	16	-	15	SP	12	12	12	12	14	11	10
	48	-	16	SP	13	13	11	14	13	13	12
Concentration en acide glutamique					10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³

TABLEAU N° 32

Concentration en sulfathiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant asparagine seule (P) ou associée au sulfathiazol (SP)							
				1	2	3	4	5	6	7	
0	24	36	-		35	36	34	33	39	38	38
2.10 ⁻⁶	24	-	8	SP	6	8	6	5	4	4	4
	40	-	27	SP	25	26	27	30	29	28	28
5.10 ⁻⁶	24	-	4	SP	3	3	4	3	3	3	3
	40	-	6	SP	4	6	7	3	3	4	3
Concentration en asparagine				10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³	

Lorsque nous avons pu nous procurer de la glutamine, nous avons essayé de retrouver la synergie notée par WARE. Les résultats consignés dans les tableaux 33 et 34 montrent que, dans nos conditions expérimentales, cette synergie n'a pu être obtenue. Dans nos premières observations, la première lecture opacimétrique n'était faite qu'au bout de 17 heures (tableau N°33); nous avons alors pensé que l'action signalée par WARE était peut-être transitoire aussi avons-nous fait dans une deuxième expérience (tableau N°34), des lectures opacimétriques plus fréquentes.

TABLEAU N° 33

Concentration en sulfathiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant glutamine seule (P) ou associée au sulfathiazol (SP)							
					1	2	3	4	5	6	7
0	17	37	-	P	36	35	35	33	36	38	35
	24	37	-	P	36	35	35	33	36	39	35
1,6.10 ⁻⁶	17	-	18	SP	18	16	28	16&35	31	24	20&32
	24	-	26	SP	24	19	27	27	32	27	26&38
3.10 ⁻⁶	17	-	17	SP	15	13&28	21	14	16	14	12
	24	-	19	SP	22	18	20	21	18	22	20
Concentration en glutamine					10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³

TABLEAU N° 34

Concen- tration en sulfa- thiazol	Temps en heures	T	S	Densité optique des tubes contenant la glutamine associée au sulfathiazol (SP)						
				1	2	3	4	5	6	7
1,6.10 ⁻⁶	6	5	2	SP	2	2	2	2	2	2
	7 1/2	10	3	SP	3	3	3	3	3	2
	9	17	3	SP	4	3	4	4	3	3
	11	25	5	SP	5	5	5	5	4	4
	13	31	7	SP	7	5	7	6	6	5
3.10 ⁻⁶	6	-	3	SP	3	3	3	3	2	2
	7 1/2	-	4	SP	4	3	3	3	3	3
	9	-	4	SP	5	4	4	4	3	3
	11	-	5	SP	6	5	5	5	4	4
	13	-	6	SP	8	7	6	5	5	5
Concentration en glutamine				10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³

En résumé, dans nos conditions expérimentales, l'action bactériostatique du sulfathiazol n'est modifiée ni par l'asparagine, ni par l'acide glutamique, ni même (contrairement à ce qui a été signalé par WARE), par la glutamine.

Chapitre IV

ESSAI D'INTERPRÉTATION DE LA SULFAMIDORÉSISTANCE:

=====

TENEUR EN COENZYME A DE ESCH. COLI SULFAMIDORÉSISTANT

=====

Dès la découverte des propriétés antibactériennes des sulfamides, l'attention a été attirée par le fait que ces substances sont bactériostatiques, c'est-à-dire qu'après un temps de latence plus ou moins long les bactéries sensibles deviennent capables de proliférer en présence de drogue. Par repiquages successifs dans des milieux à concentrations croissantes en sulfamides, il est possible d'obtenir des cultures microbiennes qui poussent d'emblée en présence des concentrations qui eussent été bactéricides pour la souche-mère. Ce phénomène d'adaptation à certains poisons, un des plus troublants de la biologie, avait déjà été étudié par EHRLICH à propos de l'action des colorants sur les trypanosomes. Les cas de résistance des micro-organismes aux poisons se sont multipliés et il ne peut être question ici de faire une revue de ce vaste sujet.

Nous voulons seulement rappeler brièvement quelques-unes des théories qui ont été proposées pour rendre compte de l'apparition de la sulfamidorésistance et nous énoncerons ensuite une hypothèse qui nous a conduit à entreprendre un travail expérimental destiné à l'étayer.

Les théories sur la résistance aux poisons, applicables au cas des sulfamides, peuvent être réduites à trois types (85):

- 1) sélection sous l'influence de sulfamides individuels différents de la masse et qui sont

d'emblée résistants à la drogue.

- 2) mutation brusque, induite par le poison, faisant apparaître des cellules résistantes.
- 3) adaptation progressive du micro-organisme au poison.

Les deux premiers groupes de théories font appel à l'existence de mutations au cours du développement microbien, mutations qui seraient spontanées d'après la première théorie; le poison se bornerait alors à permettre leur développement sélectif puisqu'il ne laisserait proliférer que les cellules ayant présenté une mutation qui, par hasard, serait favorable à la croissance en présence du poison. Au contraire, la troisième théorie ne fait appel qu'à des modifications progressives des constituants cellulaires sous l'influence de la drogue.

OAKBERG et LURIA (69) ont fait sur le développement en présence de sulfamides, des expériences analogues à celles qu'avaient faites DEMEREC (20) au sujet du développement de germes résistants à la pénicilline. Ils ont montré que *Staphyloc. aureus* donne un très petit nombre de mutants résistants au sulfathiazol, environ une cellule sur quelques milliards par génération. Le fait que quelques cultures de staphylocoques ne contiennent pas de cellules résistantes, alors que d'autres en contiennent beaucoup est la preuve qu'il ne s'agit pas d'adaptation physiologique. Le nombre de cellules résistantes issues de cultures faites à partir d'une cellule unique est très variable, ce qui est une preuve évidente de ce que la résistance est due à une mutation.

Cependant en faveur de la théorie adaptative, on peut d'abord invoquer que la concentration en sulfamides, supportée par les germes, augmente avec le nombre de repiquages (80); il est vrai que cette règle supporte de nombreuses exceptions et que les sauts

présentés dans l'intensité de la résistance aux sulfamides s'interprètent plus aisément dans l'hypothèse de mutation que dans celle de l'adaptation progressive (69). De nombreuses cultures ne s'adaptent jamais aux sulfamides; on peut dire qu'elles n'ont pas présenté la mutation qui eut permis la résistance (69).

Pour HINSHELWOOD (36), champion des théories adaptatives, la sulfamide inhibe le fonctionnement de certains enzymes et, par là, empêche la synthèse de certaines molécules nécessaires à la division cellulaire. Mais d'autres enzymes continuent à fonctionner normalement, de sorte que les molécules qui serviraient de substrat aux enzymes **inhibés** continuent à être **produites**. Cette accumulation peut modifier le cours des réactions cellulaires (déviations, "by pass" métaboliques qui conduisent au résultat habituel par des voies inhabituelles) ou peut, par le jeu des lois d'action de masses, permettre aux réactions inhibées de reprendre leur cours malgré la présence de sulfamides. L'analyse des courbes de croissance en présence de faibles concentrations de sulfamides (35), montre bien qu'il y a, pendant la phase d'adaptation, un rythme de croissance modifié indiquant que le métabolisme normal est dévié.

Puisque PAB est l'antisulfamide physiologique, une explication tentante de la sulfamidorésistance résidait naturellement dans la possibilité, pour les germes enccours d'adaptation, d'élaborer davantage de PAB. De fait, le milieu dans lequel se sont développés des micro-organismes sulfamido-résistants est doué de propriétés antisulfamides (50) et on a même pu mettre en évidence, par voie microbiologique d'abord, par voie chimique plus récemment, la présence de PAB (62). Mais là aussi, les exceptions sont nombreuses et il n'est pas rare de rencontrer des souches sulfamidorésistantes qui synthétisent moins de PAB que ne le fait la souche-mère(69). Il est vrai que les dosages ont porté

sur PAB libéré dans le milieu de culture, qu'il est toujours loisible de penser que le micro-organisme a pu conserver, à l'état intracellulaire, le PAB qu'il aurait fabriqué en excès. MOOS et LEMBERG (62), qui avaient voulu vérifier cette hypothèse, ont obtenu des résultats négatifs qui n'excluent pourtant pas la possibilité que PAB soit synthétisé en excès, mais soit aussitôt combiné sous forme d'acide folique par exemple.

Cet argument même -production accrue de PAB- n'est pas décisif en faveur de l'hypothèse adaptationniste, car on peut penser que c'est à la faveur d'une mutation que la synthèse de PAB s'est trouvée accrue. Le fait qu'il existe des micro-organismes sulfamidodépendants (qui ont besoin de sulfamides pour se développer (96) est interprété dans ce sens la sulfamide étant nécessaire pour neutraliser la surproduction de PAB due à une mutation survenue par hasard.

Le caractère héréditaire de la sulfamidorésistance, qui reste acquise même lorsque de nombreuses générations de micro-organismes se développèrent en l'absence de sulfamides, est en faveur de l'hypothèse mutationniste. A quoi les partisans de l'adaptation progressive répondent que ce n'est pas tomber dans l'hérésie que de réclamer pour les micro-organismes l'hérédité des caractères acquis, le soma et le germen étant dans la plus grande contiguïté chez les êtres monocellulaires (35)

A l'heure actuelle, il semble que les deux mécanismes: adaptation progressive et sélection de mutants, puissent tous deux intervenir pour expliquer les cas de sulfamidorésistance. Les actions biologiques de PAB sont nombreuses: synthèse d'acide folique, de méthionine, de bases puriques et pyrimidiques, de sérine.... Les sulfamides peuvent s'opposer à une ou plusieurs

des actions de PAB; d'ailleurs toutes les actions connues des sulfamides ne peuvent pas toujours s'expliquer par le fait qu'ils entrent en compétition avec PAB et PAB n'inhibe pas toutes les sulfamides. De sorte qu'en dehors des deux hypothèses que nous venons d'évoquer, d'autres encore peuvent être formulées pour rendre compte de la sulfamidorésistance. CHODAT (16) avait émis l'hypothèse que la cellule s'exerce à démanteler la molécule de sulfamide et il a même pensé que celle-ci était susceptible de servir d'aliment à certaines algues vertes.

C'est une hypothèse du même ordre que F.KAYSER et nous-même avons émise: la cellule résistante serait capable d'inactiver ou d'insolubiliser la sulfamide qu'elle aurait laissé pénétrer à travers sa membrane. De même que l'hôte peut transformer (ce qui est fâcheux du point de vue thérapeutique) la sulfanilamide en acétylsulfamide très peu soluble et très peu active, de même le micro-organisme pourrait réaliser cette acétylation. Il possède (au moins dans le cas de *Esch.coli* qui nous occupe) du coenzyme A et fait des acétylations; la présence d'un excès de substrat provoque souvent la formation d'une quantité accrue du système enzymatique capable de le modifier; il suffrait donc de penser que la présence de sulfamide acétylable provoquerait l'augmentation de production de transacétylase, de kinase et de coenzyme A. C'est pour tenter de vérifier la validité de notre hypothèse que nous avons pratiqué des dosages comparatifs de coenzyme A dans la souche-mère de *Esch.coli* et dans la souche rendue sulfamidorésistante qui en dérive.

On a pu montrer le rôle du coenzyme A dans l'acétylation de la sulfanilamide chez les êtres supérieurs. L'action des premières sulfamides employées en thérapeutique disparaissait très rapidement malgré une élimination relativement faible; on s'est rendu compte, depuis

longtemps, que ces sulfamides sont acétylés rapidement et à un taux élevé dans l'organisme. Les dérivés acétylés sont très peu solubles, leur activité propre n'a pas été très étudiée et les renseignements bibliographiques ne sont pas nombreux: KLEIN et HARRIS (46) puis SCHNITKER (81) disent que le dérivé acétylé est thérapeutiquement inactif, MARSHALL (61) et JAMES (39) insistent sur la toxicité de l'acétylsulfanilamide pour l'organisme hôte, mais la toxicité de ce corps pour les micro-organismes ne paraît pas avoir été étudiée. L'administration d'acétate, jointe à celle de sulfanilamide, protège la souris contre les effets toxiques de doses élevées de cet antibiotique (9). L'acétylation de la sulfanilamide a pu être réalisée, in vitro, sur les coupes de foie de lapin(46), mais avec des rendements très variables par suite - on le sait maintenant - de l'altération plus ou moins grande du système enzymatique responsable.

Mais c'est en 1945 que LIPMANN (53) montre que l'acétylation des amines par les coupes de foie est l'oeuvre d'un enzyme fonctionnant avec un coenzyme; ce même coenzyme est impliqué dans l'acétylation de la choline (54) et le nom de "coenzyme A" lui a été donné pour rappeler qu'il livrait de l'acétate biologiquement "actif".

Pour étayer notre hypothèse, nous avons voulu vérifier d'abord que l'acétylation de la sulfanilamide entraîne une perte de son activité antibiotique in vitro.

Nous avons cherché ensuite si l'acide pantothénique, élément de la molécule de coenzyme A dont la carence diminue l'acétylation de la sulfanilamide chez le rat (73), était capable en tant que précurseur possible du coenzyme A, de diminuer in vitro l'activité bactériostatique de la sulfanilamide.

Enfin, et c'était là le but de ces recherches, nous avons dosé comparativement le coenzyme A chez un colibacille et chez le même organisme rendu sulfamido-résistant dans l'espoir de noter, chez ce dernier, une augmentation du taux de coenzyme A.

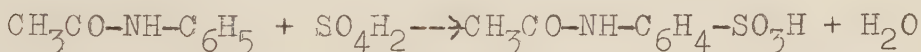
A) ----- ÉTUDE DE L'ACTION BACTÉRIOSTATIQUE DE L'ACÉTYL-SULFANILAMIDE IN VITRO.

1 - PRÉPARATION DE LA NACÉTYLSULFANILAMIDE.



La méthode biologique de KLEIN et HARRIS (46) ne nous a pas paru adaptée à nos besoins. Nous avons, par contre, essayé l'acétylation directe de la sulfanilamide en employant CH_3COCl ou l'anhydride acétique en solution dans le chloroforme ou la pyridine à ébullition. Mais la purification était difficile et le rendement en produit cherché insuffisant; aussi avons-nous adopté la méthode, toute récente, de BYRNE, ALBERTS et coll. (14).

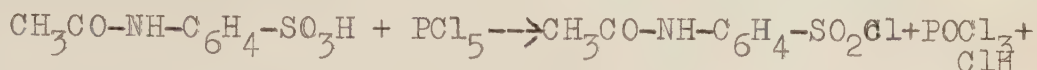
La première étape de cette synthèse consiste à former l'acide N-acétylparasulfanilique en partant de l'acétanilide et de l'acide sulfurique:



Nous avons pris 2 ml d'acide sulfurique concentré, refroidi, ajouté lentement 4 ml d'anhydride acétique, puis, lentement, en agitant constamment 2 g d'acétanilide. Après un chauffage d'une demi-heure au bain-marie à 93-100°, l'acide N-acétylsulfanilique formé se sépare; le mélange est refroidi dans de l'eau glacée, dilué avec 10 ml d'acétone glacée et filtré sur Buchner. Le produit, après lavage avec un peu d'acétone glacée, est mis sur plaque poreuse et séché aux rayons infra-rouges (à la fin de ces opérations nous avons récupéré 2 g. d'acide impur.)

Dans la seconde étape, nous préparons le chlorure de l'acide formé précédemment. L'acide ci-dessus est

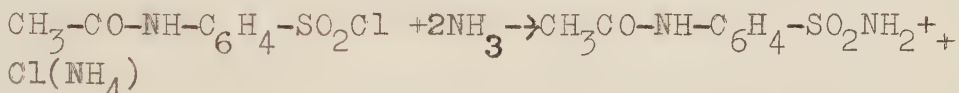
triturer avec 5,8 g de pentachlorure de phosphore en refroidissant, puis chauffé légèrement pour obtenir un liquide homogène



Après refroidissement nous avons ajouté 10 g de glace pour décomposer POCl_3 et PCl_5 . La N-acétylsulfanilamide est finalement obtenue par addition de 10 ml d'ammoniaque à 29 pour 100 à la solution glacée contenant le chlorure d'acide ci-dessus, puis chauffage au bain-marie pendant 30 minutes. Après refroidissement le pH est ramené à 3 par addition lente d'acide sulfurique.

Nous avons ensuite refroidi, filtré sur Buchner, lavé à l'eau froide et séché sur plaque poreuse.

Cette réaction schématisée par l'équation suivante:



permet d'obtenir 1,64 g d'N-acétylsulfanilamide brut. Après recristallisation dans l'eau nous avons obtenu 1,3 g de produit présentant au bain de mercure un point de fusion instantané corrigé de 219° (point de fusion théorique)

2 - ACTION DE L'ACÉTYLSULFANILAMIDE IN VITRO

Le tableau suivant permet de comparer l'activité antibiotique, in vitro, de la sulfanilamide et de son produit d'acétylation sur Esch.coli cultivé dans les conditions habituelles.

Les produits ont été dissous dans l'eau distillée au moyen d'un peu de soude et les solutions ainsi obtenues ont été amenées toutes deux à pH9; nous avons vérifié que l'addition de ces solutions alcalines au milieu de culture tamponné n'en modifie pas appréciablement le pH.

TABLEAU N° 35

Temps en heures	T	Densité optique (x 100) des tubes contenant la sulfanilamide ou l'acétylsulfanilamide					
		1	2	3	4	5	6
1° Action de la sulfanilamide :							
14	20	20	21	17	7	3	1
24	22	20	21	20	8	3	1
36	22	20	22	20	8	5	1
2° Action de l'acétylsulfanilamide :							
14		20	20	20	22	22	22
24		20	20	20	22	22	22
Concentration sulfanilamide ou dérivé acétylé		10^{-5}	5.10^{-5}	10^{-4}	5.10^{-4}	10^{-3}	2.10^{-3}

L'acétylsulfanilamide est donc absolument inactif sur *Esch.coli* in vitro, dans la large marge des concentrations essayées.

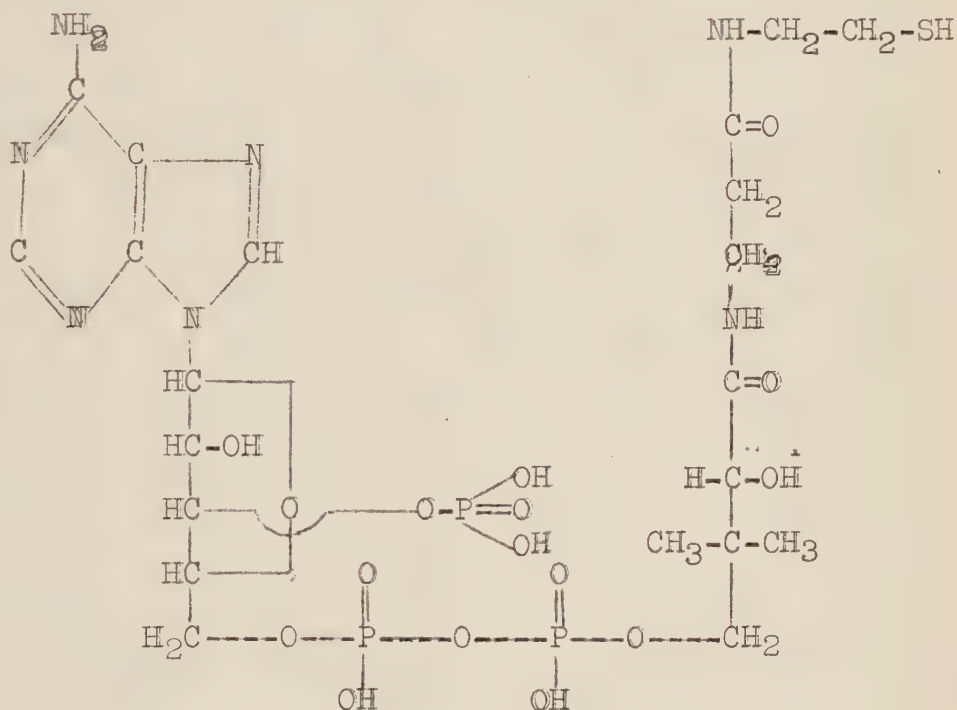
WOOD et AUSTRIAN (93) signalaient que l'acétylation de la fonction amine de PAB diminuait de mille fois son activité antisulfamide; il semble donc que la fonction amine doive être libre pour que la sulfanilamide et le PAB puissent, suivant la théorie de WOODS, trouver leur place dans les enzymes du système de l'acide folique et les autres enzymes plus ou moins connus sur lesquels les sulfamides agissent

B) ----- ÉTUDE DE L'ACTION DU PANTOTHÉNOL ASSOCIÉ A LA SULFANILAMIDE, SUR LA CROISSANCE DE ESCH.COLI.-

Nous avons déjà étudié l'acide pantothénique en tant qu'inhibiteur de l'action du salicylate de sodium; nous l'emploierons ici dans un tout autre but.

L'acide pantothénique est l'un des composants essentiels du coenzyme A (54), qui est la (68):

3'-5'-diphosphoadénosine-pyrophosphate-4'phosphopantothéine sa formule est, d'après LYNNEN(55):



On sait que certains micro-organismes font la synthèse du coenzyme A à partir de l'acide pantothénique; KLEIN (45) par exemple a enrichi des levures en coenzyme A par incubation de cellules non proliférantes sur des milieux contenant de l'acide pantothénique. Parfois aussi cette conversion semble nécessiter la présence de vitamine B₁₂ (cobalamine) et YACOWITZ (95) montre que cette vitamine diminue la quantité d'acide pantothénique libre dans le foie mais non dans le muscle;

le foie transforme sans doute l'acide pantothénique en coenzyme A grâce à la présence de cobalamine.

Les travaux de WRIGHT et WELSCH (94), POPP et TROTTER (73), et ceux de BOXER (11) ont montré qu'il existe chez le rat et le poulet une relation entre la sulfamide administrée, la teneur du foie en coenzyme A en acide pantothénique et aussi en acide folique. Pour POPP et TROTTER, le sulfathiazol augmente la teneur du foie en coenzyme A seulement s'il y a de l'acide folique dans le régime. WRIGHT et WELSCH (94) disent que des rats nourris en régime purifié additionné de sulfamide présentent des symptômes d'achromotrichie et des troubles de croissance qui sont guéris par administration d'acide folique; l'addition d'acide pantothénique seul n'est pas suffisante pour amener cette guérison.

Dans la série d'expériences suivantes, nous avons cherché si le pantothénol (Roche) - alcool correspondant à l'acide pantothénique - qui est la plupart du temps capable de remplacer cet acide - modifiait l'action de la sulfanilamide sur Esch.coli. Les modifications observées ont été peu importantes, aussi avons-nous ajouté au milieu de l'acétate destiné à faciliter l'acétylation de la sulfanilamide; enfin, l'observation de YACOWITZ (95) rapportée ci-avant nous a engagé à essayer l'effet de l'addition de cobalamine.

1) ASSOCIATION PANTOTHÉNOL-SULFANILAMIDE:

Nous pensions que l'addition de pantothénol permettrait à Esch.coli de faire la synthèse d'une quantité accrue de coenzyme A et, par là, de détoxiquer la sulfanilamide en l'acétylant. Le tableau N°36 montre d'abord que le pantothénol employé seul à des concentrations comprises entre le millionième et le centième n'inhibe pas le développement de Esch.coli mais semble, au contraire, le favoriser. Associé à la sulfanilamide, le pantothénol est sans action notable sauf lorsque la

concentration en sulfanilamide est $2,5.10^{-4}$. Dans ce cas seulement (et encore bien plus nettement dans la seconde expérience que dans la première) le pantothénol s'oppose légèrement et de façon irrégulière à l'action bactériostatique de la sulfamide, conformément à ce que nous avons pensé.

TABLEAU N° 36

Concentration en sulfanilamide	Temps en heures	T	S		Densité optique (x 100) des tubes contenant le pantothénol seul (P) ou associé à la sulfanilamide (SP)				
					1	2	3	4	5
0	16	27	-	P	33	34	35	32	28
$2,5.10^{-4}$	16	-	17	SP	19	21	19	18	15
	24	-	26	SP	26	25	25	26	20
Autre expérience :									
0	16	18	-	P		20	20	23	
	22	19	-	P		22	21	21	
$2,5.10^{-4}$	16	-	2	SP		5	4	1	
	22	-	3	SP		11	9	2	
	24	-	4	SP		18	12	2	
	40	-	12	SP		22	24	15	
$3,5.10^{-4}$	16	-	8	SP		5	5	7	
	22	-	11	SP		6	6	6	
	24	-	12	SP		12	8	10	
5.10^{-4}	16	-	2	SP		2	2	2	
	22	-	2	SP		3	3	3	
	24	-	4	SP		4	3	4	
	72	-	11	SP		11	10	12	
Concentration en pantothénol					10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}

2) ADDITION D'ACÉTATE A L'ASSOCIATION
PANTOTHÉNOL-SULFANILAMIDE.-

Les résultats précédents, sans être probants, montraient parfois l'antagonisme cherché, aussi avons-nous voulu voir si l'addition d'acétate au milieu de culture, jointe à celle de pantothénol, permettrait une détoxification plus efficace de la sulfanilamide, sans doute par acétylation.

Les valeurs du développement bactérien, consignées dans le tableau suivant, montrent que l'addition d'acétate aux concentrations de 1 et 2 pour 1.000 à la sulfanilamide (3.10^{-4}) et au pantothénol (10^{-5} à 10^{-3}) est pratiquement sans action, l'action bactériostatique faible de la sulfanilamide à la concentration choisie est, dans l'ensemble, très légèrement diminuée par la présence de l'acétate et du pantothénol.

TABLEAU N° 37

Concentration en sulfanilamide	Temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant de l'acétate et du pantothénol seul (P) ou associé à la sulfanilamide (SP)			
				1	2	3	
Cultures sans acétate :							
0	16	21	-	P	24	24	23
3,5.10 ⁻⁴	16	-	8	SP	6	7	8
Cultures en présence d'acétate (concentration 10 ⁻³):							
3.10 ⁻⁴	16	-	8	SP	9	8	10
	23	-	13	SP	15	16	14
Cultures en présence d'acétate (concentration 2.10 ⁻³):							
3.10 ⁻⁴	16	21	7	SP	14	8	7
	23	22	14	SP	17	15	13
Concentration en pantothénol				10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	

3) ADDITION DE COBALAMINE A L'ASSOCIATION PANTOTHENOL-SULFANILAMIDE.

Nous inspirant des conclusions de YACOWITZ (95), nous avons voulu voir si la vitamine B₁₂ faciliterait la transformation du pantothénol surajouté en coenzyme A ce qui, d'après notre hypothèse, permettrait l'acétylation de la sulfanilamide et diminuerait son activité antibiotique.

Aux concentrations 10^{-8} et 10^{-7} , la vitamine B₁₂ (Spécia) ajoutée à la sulfanilamide (aux concentrations 3.10^{-4} à 6.10^{-4}) et au pantothénol 10^{-4} , n'a pas modifié l'action propre de l'association sulfanilamide-pantothénol.

Notons de plus que la cobalamine ne modifie pratiquement pas l'action de la sulfanilamide dans l'association sulfanilamide-cobalamine.

C)-DOSAGES COMPARATIFS DE COENZYME A CHEZ ESCH.COLI NORMAL ET RENDU SULFAMIDORESISTANT.

Dans cette dernière partie, nous avons dosé le coenzyme A comparativement dans une souche de Esch. coli adapté à se développer sur milieu synthétique contenant 10 g pour 1.000 de sulfanilamide et dans la souche originelle.

1) ACQUISITION DE LA SULFAMIDORESISTANCE (1)

Esch.coli est rendu résistant par passages successifs sur milieu synthétique (formule p.5) contenant des quantités croissantes de sulfanilamide.

Comme l'opération est hasardeuse, il est nécessaire pour ne pas risquer de perdre la souche déjà partiellement adaptée de faire les cultures en triple exem-

(1) Nous remercions notre camarade M. PIERFITTE, Assistant à la Faculté, pour l'aide qu'il nous a apportée lors de ces longues opérations d'adaptation.

plaire. Nous opérons à l'aide d'erbans d'une capacité de 100 ml contenant 10 ml de milieu additionné de sulfanilamide. Les cultures sont agitées à la température de 37° pendant toute la croissance, nous obtenons ainsi un développement plus rapide. Il est indispensable de faire des ensemencements abondants, 1 ml de la culture précédente ayant atteint son complet développement.

Esch.coli est cultivé 12 fois en présence de chacune des concentrations suivantes:

0,20 - 0,50 - 1 - 2 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 g pour 1000 de sulfanilamide.

La souche adaptée a alors été réensemencée sur milieu sulfanilamidé à 10 g pour 1000 toutes les 24 heures. Nous avons commencé nos dosages de coenzyme A sur Esch.coli ayant subi 130 passages sur ce milieu sulfanilamidé à 10 g pour 1.000 et nous avons continué à le réensemencer sur le même milieu.

2) DOSAGE DU COENZYME A:

A la méthode d'arsénolyse (83) nous avons préféré la méthode un peu plus ancienne (1948) mais toujours très employée, mise au point par KAPLAN et LIPMANN(41) parce qu'elle mettait en jeu l'action même que nous voulions étudier: l'acétylation de la sulfanilamide.

Principe de la méthode:

La réaction globale est la suivante:
acétate + sulfanilamide $\xrightarrow{\text{enzymes+coenzyme A}}$ acétylsulfanilamide.

L'acétate et la sulfanilamide sont ajoutés à de l'extrait de foie de pigeon agissant comme source d'apoenzymes (transacétylase et acétokinase) et à un extrait bactérien agissant comme source de coenzyme A que

l'on veut doser⁽¹⁾. Le rendement de la réaction est mesuré par le dosage de la sulfanilamide qui n'a pas été acétylée. La réaction de diazotation de BRATTON et MARCHAL (12) est positive avec la sulfanilamide et négative avec l'acétylsulfanilamide; la différence entre les intensités des colorations des diazotations faites au début et à la fin de l'expérience permet de calculer le taux de l'acétylation.

Pour établir la correspondance entre le taux d'acétylation et la quantité de coenzyme A existant dans l'extrait bactérien, il faut faire un essai analogue en employant du coenzyme A pur ou, tout au moins, un coenzyme A purifié et de titre connu. Une gamme de solutions de coenzyme A permet de construire une courbe du taux d'acétylation en fonction de la quantité de coenzyme mise en oeuvre. Cette courbe est rectiligne dans une certaine partie de son cours, seules sont valables les déterminations du coenzyme A pour lesquelles le taux d'acétylation se trouve dans la partie rectiligne. Cela oblige à faire plusieurs déterminations simultanées avec des extraits bactériens (source de coenzyme A) diversement dilués et de ne tenir compte que de ceux tombant dans la zone de proportionnalité entre taux d'acétylation et teneur en coenzyme A. Il est nécessaire de faire un essai à blanc, sans coenzyme A, pour tenir compte de l'activité coenzymatique qui subsiste toujours dans les préparations d'apoenzyme.

(1) Il est nécessaire d'ajouter dans le milieu réactionnel ATP, comme source d'énergie permettant la formation intermédiaire d'esters phosphoriques et la synthèse de l'acétylcoenzyme A, du citrate en tant qu'inhibiteur des traces d'ATP-ase, de la cystéine pour maintenir le coenzyme A sous sa forme réduite (Co.-SH) et du bicarbonate comme tampon. Rappelons que ATP est l'abréviation de acide adénosine triphosphorique.

Les résultats s'expriment en Unités Lipmann: l'unité de coenzyme A est l'activité contenue dans une prise d'essai qui donne la moitié de l'acétylation maxima que l'on peut obtenir dans les conditions de l'expérience, celle-ci étant d'environ 80 pour 100, les meilleures mesures sont obtenues quand on acétyle environ 40 pour 100 de la sulfanilamide.

Mode opératoire:

Nous nous sommes conformé à celui de KAPLAN et LIPMANN (41)

a) PRÉPARATION D'UN EXTRAIT ACÉTONIQUE DE FOIE DE PIGEON.

Cet extrait servira de source d'apoenzymes (transacétylase et acétolinase).

Les pigeons⁽¹⁾ sont décapités et saignés à blanc, les foies enlevés aussi rapidement que possible et refroidis dans la glace. On mesure un volume d'acétone, préalablement refroidie à 0°, correspondant à 20 fois le poids du foie. Ce liquide est placé dans le bol d'un mélangeur (atomixer Cadillac) préalablement refroidi à 0°, on lui ajoute alors le foie grossièrement découpé puis on fait tourner le mélangeur à la glacière pendant 2 minutes à 12.000 tours/minute. Le foie est transformé en une bouillie brunâtre qui est filtrée rapidement sur Buchner refroidi à 0°, puis lavé à l'acé-

(1) Nous avons utilisé au total 12 pigeons; nous avons dû nous contenter d'animaux de poids variable, les poids des foies ont varié de 5 à 12 g et leur activité enzymatique a été très variable aussi, mais le rapport de l'activité au poids du foie ne nous a pas paru constant. L'âge, le régime alimentaire, l'état de santé de l'animal interviennent certainement.

tone glacé et à l'éther glacé, anhydre et privé de peroxydes(88). La poudre de foie dite, poudre acétonique, est séchée sous vide, quand l'éther a été complètement éliminé on termine la dessiccation sur anhydride phosphorique dans le vide. On crible alors la poudre sur tamis module 200 pour éliminer le tissu conjonctif et faciliter l'épuisement ultérieur.

L'extrait enzymatique est obtenu en mélangeant la poudre acétonique avec 10 fois son poids de solution 0,02 M de bicarbonate de sodium et en agitant continuellement pendant 15 minutes, on centrifuge alors à basse température. Le liquide surnageant rouge légèrement opalescent est fortement congelé pendant une nuit, ce qui a pour but de précipiter l'enzyme hydrolysant l'ATP ou ATP-ase. L'extrait doit être décongelé et conservé à la température ambiante pendant 5 heures avant utilisation, puis centrifugé; ce vieillissement ("aging") permet à certaines phosphatases du foie d'agir et de détruire le coenzyme A hépatique dont la présence fausserait le dosage du coenzyme A bactérien.

Cet extrait peut se conserver quelques jours à la température de -5° , mais la conservation fait perdre une partie de l'activité, aussi est-il préférable de conserver la poudre acétonique en glacière et de ne faire l'extrait qu'au moment du besoin⁽¹⁾

b) CULTURE DE ESCH. COLI ET PREPARATION DE L'EXTRAIT BACTERIEN:

C'est dans cet extrait qu'on se propose de doser le coenzyme A.

Les cultures sont faites en ballons de 3 ou de 2 litres, sur notre milieu habituel (formule p.5) additionné ou non, suivant le cas, de sulfanilamide. Pour

(1) Cette poudre acétonique de foie de pigeon se trouve d'ailleurs dans le commerce (Armour & Co U.S.A.)

hâter la croissance, les cultures sont fortement aérées, pour ce faire, on produit une constante aspiration d'air au moyen d'une trompe à vide; l'air inspiré est filtré par passage sur un tampon de coton et les bouchons sont collodionnés pour éviter tout risque de contamination.

On mène de front deux cultures, l'une avec la souche de Esch.coli, l'autre avec cette souche rendue sulfamidorésistante. L'ensemencement est fait au moyen de 25 ml (par litre de milieu) d'une suspension de Esch. coli, résistant ou non, prélevée en fin de phase de croissance logarithmique, c'est-à-dire au bout de 8 heures quand la densité atteint 20 à 25.

Après 12 à 13 heures à 37° avec aération, les deux lots de cultures qui ont une densité optique de 40 à 45 et ont donc le même âge biologique sont super-centrifugés séparément à 30.000 tours/minute. Les bactéries sont aussitôt lavées, avec de l'eau contenant 9 g pour 1.000 de chlorure de sodium, deux fois en général; lorsque la culture a été faite sur milieu sulfamidé, les lavages doivent être plus nombreux (jusqu'à six lavages) pour éliminer complètement la sulfanilamide, ce dont on s'aperçoit parce que la réaction de Bratton et Marshal devient négative.

Aussitôt les lavages terminés, on pèse exactement 5 g de bactéries humides dans un petit ballon; on ajoute 10 ml d'eau distillée, on en fait une pâte liquide homogène et on porte à l'ébullition en agitant constamment. Cette opération a pour but de détruire les apoenzymes bactériens, le coenzyme A est thermostable. Le contenu du ballon est alors centrifugé à -1° à 10.000 tours/minute. Le liquide surnageant jaune ambré et légèrement opalescent contenant le coenzyme A de 5 g de bactéries humides est utilisé aussitôt ou conservé à -15° quelques heures tout au plus.

Pour connaître le titre exact de cet extrait, on sèche sous vide phosphorique poussé un poids très exactement connu de bactéries humides (pour 2 g de bactéries humides on obtient 0,40 g de matière sèche environ).

c - DOSAGE PROPREMENT DIT

On mesure dans des tubes à essai de 8 mm de diamètre et 8 cm de long:

1°) 0,02 à 0,3 ml de l'extrait bactérien précédent (pour les faibles quantités on utilise une dilution au dixième de l'extrait)

2°) 0,3 ml du mélange suivant:

solution de sulfanilamide 0,004 <u>M</u>	10 ml.
solution d'acétate de Na ⁽¹⁾ <u>M</u>	2,5ml
solution d'ATP sel de K ⁽¹⁾ 0,05 <u>M</u>	8 ml
solution de citrate trisodique 0,2 <u>M</u>	10 ml

le pH doit être 7 environ

3°) 0,08 ml d'une solution récente de bicarbonate M

4°) 0,1 ml de solution récente de L-cystéine 0,1 M

5°) 0,25 ml d'extrait de foie de pigeon préparé comme il a été dit.

6°) eau q.s.p/ 1,03 ml

Chaque essai porte sur une gamme de tubes contenant des quantités variables de l'extrait bactérien à doser (de façon à ce que l'acétylation donne sûrement deux ou trois valeurs utilisables.) Nous mesurons habituellement: 0,02 0,03 0,05 0,075 0,15 0,20 0,30 ml

(1) Nous avons employé de l'ATP sel dibarytique "Sigma" qui a été solubilisé en ATP sel de potassium par contact prolongé avec la quantité théorique de sulfate neutre de potassium soit 2 ml d'une solution à 7 p.100 (le sel de baryum n'est que peu soluble), le sulfate de baryum formé est éliminé par centrifugation. Pour l'ATP monosodique du "Laboratoire Auclair" l'ATP disodique que "Fluka" que nous avons utilisé également, il convient d'ajouter la quantité de sulfate de potassium indiquée ci-dessus afin d'être ramené dans les mêmes conditions.

de l'extrait à dower; chaque essai est fait en double ou mieux en triple exemplaire.

Une série de dosages comporte trois gammes de déterminations:

- la première se fait avec des quantités croissantes d'extrait de Esch.coli habituel
- la deuxième emploie les mêmes quantités d'un extrait provenant de Esch.coli sulfamidorésistant,
- la troisième est faite à partir d'un coenzyme A standard.

Nous avons utilisé un coenzyme A qui nous a été fourni par la maison "Sigma" (USA) et qui titre 4,8 unités Lipmann par mg (1,2 p.100 de pureté). On fait une solution de coenzyme A titrant 2 unités dans 0,3 ml et la gamme comprendra quatre concentrations:

0,5 1 1,33 et 2 unités par tube.

Les tubes contenant tous 1,03 ml de mélange sont alors bouchés et placés au bain-marie à 37° pendant 2 heures.

La dernière partie du dosage consiste à déterminer la quantité de sulfanilamide restant par la méthode de Bratton et Marshal(12). Pour cela, quand l'incubation est terminée, on ajoute dans chaque tube 4 ml de solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100. On centrifuge. La sulfanilamide est dosée sur 1 ml du liquide surnageant:

On mélange en agitant chaque fois:

1 ml du déféquat trichloracétique précédent
1 ml de solution de nitrite de Na à 1 p. 1.000
1 ml de solution de sulfamate de NH_4 à 5 p. 1.000
1 ml de solution de naphtyléthylènediamine (chlorhydrate) à 1 p. 1.000

La coloration est mesurée après 10 minutes au photocolorimètre de COLEMAN; la lecture se fait dans le vert (540 m μ). La quantité de sulfanilamide est alors directement lue sur une courbe établie au préalable avec une solution titrée de sulfanilamide convenable-

ment diluée et traitée comme ci-dessus.

d - CALCUL.

La quantité de sulfanilamide acétylée dans un tube est égale à la différence entre la quantité de sulfanilamide ajoutée avant incubation soit 68 μ g et la quantité retrouvée après incubation. Mais il faut retrancher de ce résultat la quantité de sulfanilamide acétylée par les traces de coenzyme A qui contaminent l'extract de foie et n'ont pas été totalement détruites par autolyse lors de l' "aging"; c'est le but de l'essai à blanc qui est fait en même temps que les essais précédents, mais où l'extract bactérien (source de coenzyme A) est supprimé.

On établit la courbe de la sulfanilamide acétylée en fonction de la teneur en coenzyme A standard (troisième gamme de tubes). Cette courbe n'est jamais absolument reproductible d'une expérience à l'autre, c'est pourquoi il faut la recommencer lors de chaque dosage (voir p.115 courbe II)

Exemple de calcul:

Grâce à la gamme de tubes contenant des quantités connues de coenzyme A (3^o gamme du dosage), il est possible de savoir quelle quantité de sulfanilamide a été acétylée par une quantité connue de coenzyme A, dans les conditions définies ci-dessus et dans le cas particulier d'un extract de foie.

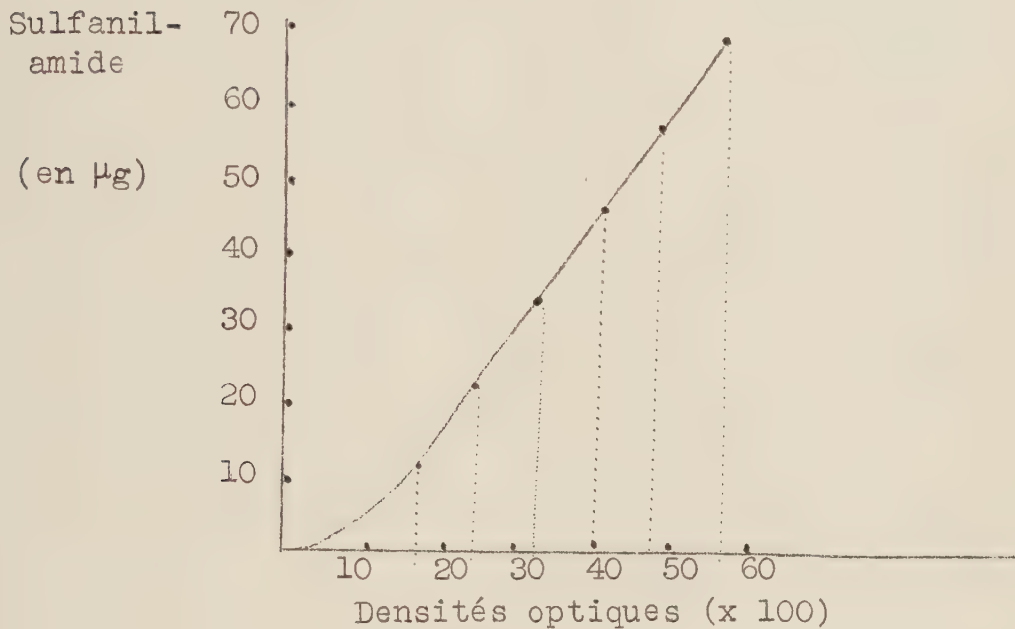
Prenons par exemple le tube contenant 2 unités de coenzyme A, il donne une densité optique de 11,5, ce qui, d'après la courbe I correspond à 7 μ g de sulfanilamide. La quantité de sulfanilamide qui avait été placée dans ce tube était de 68 μ g; la quantité de sulfanilamide qui a disparu par acétylation est donc:
 $68 - 7 = 61 \mu$ g

Mais rappelons que ce chiffre est entaché d'une erreur par excès du fait des traces de coenzyme A qui contaminent toujours les préparations d'apoenzyme. La

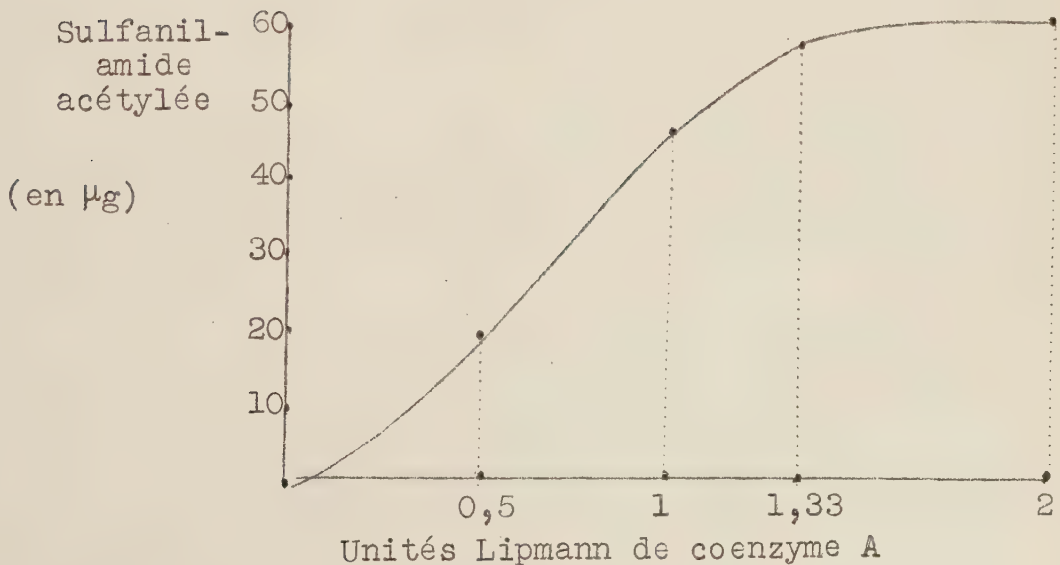
Nous avons reproduit ci-dessous les deux courbes qui nous ont servi à faire ces calculs :

Courbe I - Etalonnage des densités optiques lues après la réaction de Bratton et Marshall en sulfanilamide.

Courbe II - Courbe de la sulfanilamide acétylée en fonction du coenzyme A standard, dans le cas particulier de l'exemple numérique (page II4).



Courbe I



Courbe II

quantité de sulfanilamide acétylée par ces traces de coenzyme est connue, grâce à l'essai à blanc où la préparation co-enzymatique a été remplacée par de l'eau distillée. Dans l'exemple choisi l'essai à blanc contenant encore après traitement 67 μ g de sulfanilamide non acétylée, la quantité de sulfanilamide acétylée est donc 68 μ g - 67 μ g = 1 μ g. Cette valeur (1 μ g) de l'essai à blanc doit être déduite de la quantité de sulfanilamide acétylée trouvée plus haut (61 μ g), de sorte que au total, 2 unités de coenzyme A correspondent à: 61 μ g - 1 μ g = 60 μ g de sulfanilamide acétylée. En répétant ces mesures et ces calculs, nous pourrions tracer une courbe (courbe II) de correspondance entre les quantités de coenzyme A mises en oeuvre et les quantités de sulfanilamide qu'elles acétylent.

Dans le dosage proprement dit, pour savoir combien d'unités de coenzyme A sont contenues dans une quantité connue d'extrait bactérien ajoutée à un tube, il suffira donc de lire en abscisse sur la courbe II le nombre d'unités de coenzyme A correspondant au nombre de μ g de sulfanilamide acétylée. Si par exemple 0,03 ml d'extrait bactérien a amené une acétylation, compte tenu de la correction, de 23 μ g de sulfanilamide, cette acétylation correspond d'après la courbe II à 0,58 unité de coenzyme A.

La quantité de coenzyme A contenue dans 10 ml d'extrait bactérien qui représentent la teneur en coenzyme A de 5 g de Esch.coli humide ou 0,870 g de Esch.coli sec est:

$$\frac{0,58 \times 10}{0,03} = 193,7 \text{ unités Lipmann}$$

il y a dans 1 g de Esch.coli sec:

$$\frac{193,7}{0,87} = 223 \text{ unités Lipmann}$$

e) RÉSULTATS:

- 1°) Esch.coli cultivé sur milieu synthétique sans addition de sulfanilamide.

Esch.coli (souche habituelle) non adapté aux sulfamides a présenté, dans une série d'essais faits à plusieurs jours d'intervalle, les teneurs suivantes en coenzyme A, exprimées en unités Lipmann et rapportées à 1 g de Esch.coli sec:

152 - 164 - 178 - 210 - 223 - 246

- 2°) Esch.coli sulfamidorésistant, cultivé en l'absence de sulfanilamide, l'inoculum provenant d'une culture sur milieu synthétique additionné de 10 p.l.000 de sulfanilamide; unités de coenzyme A par g de germes secs:

218 - 281

Ces deux dosages ont été faits de pair avec les dosages portant sur Esch.coli non adapté, ayant donné les valeurs suivantes:

210 - 246

- 3°) Esch.coli sulfamidorésistant cultivé en présence de sulfanilamide.

Nous n'avons pu faire cette culture sur milieu contenant 10 g pour 1.000 de sulfanilamide parce que, lors des centrifugations, le liquide ne reste plus à 37° et que la sulfanilamide s'insolubilise partiellement, il précipite alors avec les bactéries ce qui rend illusoire la suite du dosage.

Dans une première série d'expériences nous avons cultivé Esch.coli, pour la récolte, sur sulfanilamide à 5 g pour 1.000; la teneur en coenzyme A a été alors:

259 - 273 - 302

Les dosages faits simultanément avec Esch.coli non adapté avaient donné respectivement les valeurs suivantes: 152 - 164 - 223

Dans une autre série d'expériences, nous avons pu mener à bien la séparation de Esch.coli ayant poussé sur milieu synthétique contenant 9 pour 1.000 de sulfanilamide; sa teneur en coenzyme A était:

225

celle de Esch.coli non adapté traité en même temps était: 178 unités par g de Esch.coli sec

f) DISCUSSION

Nous avons fait au total 6 dosages comparatifs de dosages de coenzyme A sur Esch.coli, adapté ou non à la sulfanilamide; avec ce que l'on sait des variations qui accompagnent ce genre de dosages biologiques, notre nombre total de dosages est insuffisant pour tirer des conclusions définitives. Il faudrait pour cela faire des dosages plus nombreux, les faire porter sur diverses espèces de micro-organismes, et sur divers types de sulfamides; il faudrait voir aussi si la sulfamidorésistance ne se rencontre que chez les sulfamides susceptibles d'être acétylés; il faudrait déterminer également si la teneur en coenzyme A s'accroît brusquement lorsque cesse la bactériostase chez le micro-organisme non adapté cultivé en présence d'une quantité de sulfamide assez faible pour permettre une croissance retardée.

Le temps nous a manqué pour mener ce travail jusqu'à son terme; il a fallu de longs efforts pour nous procurer les produits chimiques, les produits biologiques, les appareils (notamment les centrifugeuses rapides travaillant dans une glacière ou, mieux, centrifugeuse travaillant dans une atmosphère refroidie à -20°)

Les six valeurs trouvées chez Esch.coli (souche-mère) rapportées plus haut, donnent une moyenne d'environ 200 unités Lipmann de coenzyme A, toutes les valeurs étant comprises entre 150 et 250 unités. KAPLAN et LIPMANN(41) avaient indiqué 320 unités et OCHOA(70) 195 à 260 .

Les six valeurs trouvées chez *Esch.coli* sulfamidorésistant donnent une valeur moyenne de 260 unités de coenzyme A toutes les valeurs étant comprises entre 220 et 300 unités environ; la teneur moyenne en coenzyme A de *Esch.coli* sulfamidorésistant est donc de 30 p. 100 supérieure à celle de la souche-mère.

Les valeurs fournies par *Esch.coli* sulfamidorésistant, mais cultivé, en l'absence de sulfanilamide donnent une moyenne de 250 unités; donc de 25 p. 100 supérieure à celle trouvée pour la souche-mère. Les valeurs trouvées pour *Esch.coli* résistant cultivé en présence de 5 g p. 1.000 de sulfanilamide donnent une moyenne de 280 unités, donc de 40 p. 100 supérieure à celle trouvée pour la souche-mère. Mais il faut remarquer que *Esch.coli* cultivé en présence de 9 g. pour 1.000 de sulfanilamide a donné une valeur plus faible (226 unités), cette valeur était malgré tout bien supérieure à celle trouvée pour le témoin (178 unités) et si, malgré nos lavages soigneux il était resté des traces de sulfanilamide sur les corps bactériens, le dosage s'en serait trouvé faussé, faisant croire à un taux d'acétylation plus faible, donc à une moindre teneur en coenzyme A.

L'ensemble de nos résultats est assez cohérent pour pouvoir affirmer que la teneur en coenzyme A de *Esch.coli* rendu sulfamidorésistant n'est pas très fortement augmentée; on pouvait penser qu'elle serait décuplée ou quintuplée, il n'en est certainement rien. Cette augmentation en coenzyme A est du même ordre de grandeur que celle (70 p. 100) rencontrée chez le poulet qui a reçu un régime contenant du sulfathiazol (73). Cependant l'augmentation de la teneur de *Esch.coli* sulfamidorésistant en coenzyme A, quoique modérée, nous paraît nette et susceptible de jouer un rôle dans le mécanisme d'adaptation aux sulfamides.

En résumé: la teneur en coenzyme A de Esch.coli rendu sulfamidorésistant n'est pas très différente de celle de la souche-mère; dans toutes nos expériences, elle a été supérieure (en moyenne de 30 pour 100), ce qui pourrait peut-être rendre compte du mécanisme de l'adaptation de Esch.coli à la sulfanilamide.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

=====

- I - Dans un court chapitre introductif, nous avons exposé les diverses techniques employées dans nos recherches.
- II - Nous avons tout d'abord indiqué un mode facile de préparation d'un dérivé mercuriel de la sulfanilamide, auquel l'analyse nous a permis d'attribuer la formule d'un sulfanilamidate de mercure:
 $(\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH})_2$. Les propriétés chimiques et pharmacologiques de ce corps sont celles d'un sel mercurique et son pouvoir antimicrobien est du même ordre que celui du chlorure mercurique, mais l'action sur la souris infectée par *Salmonella typhi murium* est peu marquée. Sa toxicité (2cg par kilo de cobaye) est nettement moins élevée que celle du sublimé; il possède une action diurétique inconstante, la dose diurétique se situe autour de 1 mg par kilo d'animal.
- III - Dans un second chapitre nous avons étudié les modifications apportées à l'action bactériostatique des sulfamides par leur association avec différents corps et nous avons tenté parfois l'analyse des modalités des effets de ces associations.
- A - Association du sulfathiazol avec des corps susceptibles de former des systèmes oxydo-réducteurs.
- 1) L'association de cette sulfamide avec l'hydroquinone et avec la benzoquinone est plus active que chacun des composés employés seuls, mais la synergie sulfamide-hydroquinone est plus nette in vitro qu'elle ne l'est in vivo.

2) L'alcalinité des mélanges contenant le sulfathiazol et l'hydroquinone ou la quinone provoque le brunissement de ces solutions à l'air; les solutions colorées vieilles sont moins actives que les solutions fraîches. Esch.coli en se développant décolore ces solutions en même temps qu'il réduit la benzoquinone en un dérivé phénolique probablement l'hydroquinone.

3) Le développement bactérien n'est pas nettement influencé par les variations du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, sous l'influence de la quinone ajoutée au milieu de culture.

4) Le dibenzoyl-2-méthyl-naphto-hydroquinone disulfonate de sodium est sans action sur le développement de Esch.coli; ce corps ne renforce guère l'action bactériostatique du sulfathiazol.

B - Analyse des modalités de la synergie sulfamide-salicylate.

1) Nous n'avons pu trouver d'explication de la synergie salicylate-sulfamide dans un effet dépresseur de l'association sur la respiration de Esch.coli non proliférant; cet effet dépresseur existe cependant, mais seulement pour de relativement fortes concentrations de l'association.

2) La respiration du tissu hépatique peut être parfois renforcée, parfois déprimée sous l'action de la sulfamide et la nette action dépressive du salicylate sur la respiration de ce même tissu n'est jamais renforcée, elle est même parfois déprimée quand la concentration en salicylate est faible; on ne saurait donc retenir l'hypothèse que le salicylate potentialise l'effet toxique de la sulfamide vis-à-vis de la cellule-hôte pour expliquer l'action antimicrobienne bien moins nette de cette association in vivo.

3) L'effet antagoniste que produit l'acide

pantothénique sur le salicylate a été retrouvé dans nos expériences sur la croissance de *Esch.coli*. Vis-à-vis de ce même test, l'acide pantothénique est également inhibiteur de l'effet dépresseur exercé par l'association sulfathiazol-salicylate. Par contre, la respiration du tissu hépatique broyé, déprimée par l'association sulfanilamide-salicylate n'est pas modifiée par l'addition de pantothénate au mélange.

C - Effets de l'association des sulfamides avec
différents inhibiteurs d'enzymes et antisepti-
ques sur la croissance de *Esch.coli*

1) La présence du 2-4-dinitrophénol inhibiteur des oxydations phosphorylantes, ne modifie pas de façon nette l'action propre du sulfathiazol.

2) L'acide malonique inhibiteur de la succinodeshydrogénase n'a aucune action sur la croissance du colibacille, aussi bien seul qu'associé au sulfathiazol.

3) Deux agents connus pour leur propriété de complexer les métaux biologiquement actifs ont été étudiés seuls et associés au sulfathiazol. L'action antibactérienne très marquée de la 8-hydroxyquinoléine (oxine) n'est guère modifiée par son association in vitro ou in vivo avec le sulfathiazol; celle de l'éthylènediaminetétracétate de sodium (complexon III) est au contraire nettement renforcée par cette sulfamide; l'association de doses d'oxine et de complexon qui, prises isolément, présentent une légère action bactériostatique, produit fréquemment une levée d'inhibition. Ces résultats ont été discutés à la lumière des idées exprimées par FEENEY.

4) L'association avec le borate de sodium et avec l'acide borique ne modifie pas sensiblement l'action antibactérienne de la sulfamide; pour certaines concentrations nous avons mis en évidence un

certain antagonisme qui doit rendre prudent lorsqu'on associe des deux corps dans un but thérapeutique (collyres).

D - Association du sulfathiazol avec des corps susceptibles de présenter des propriétés antisulfamides.

L'acide p-aminohippurique est antisulfamide, mais à des concentrations de l'ordre du millième, cette action est due à la contamination du produit commercial par des traces d'un antisulfamide étranger, très probablement PAB. L'action bactériostatique du sulfathiazol n'est modifiée ni par la rutine, ni par la glutamine, bien que des auteurs, dans des conditions expérimentales différentes, aient signalé une synergie entre ces agents.

IV - Nous avons enfin donné une interprétation de la sulfamidorésistance, chez le colibacille, en fonction de la teneur en coenzyme A, de la souche-mère et de la souche sulfamidorésistante qui en dérive. La cohérence de nos résultats nous permet de dire que la teneur en coenzyme A de la souche sulfamidorésistante est légèrement augmentée par rapport à celle de la souche-mère; dans toutes nos expériences en effet, elle a été supérieure à celle de la souche-mère (en moyenne de 30 p. 100), ce qui pourrait peut-être rendre compte du mécanisme de l'adaptation de Esch.coli à la sulfanilamide; l'adaptation serait due à l'augmentation de la teneur en coenzyme A ce qui permettrait une meilleure acétylation des sulfamides et les acétylsulfamides sont sans action sur la croissance de Esch.coli.

BIBLIOGRAPHIE

=====

- 1 - ADRIANI J.-
Effects of anesthetic drugs upon rats treated with sulfanilamide
J.Lab.Clin.Med.1939, 24, 1066-71
- 2 - ALBERT A., GIBSON M., RUBBO S.-
The influence of chemical constitution on antibacterial activity. Part VI: The bactericidal action of 8-hydroxyquinoline (oxine)
Brit.J.Exp.Path.1953, 34, 119-30
- 3 - ANDERSON B.I., SWABY R.J.- F
Factors influencing the fungistatic action of 8-hydroxyquinoline (oxine) and its metallic complexes
Austr.J.sci.Res.1951, 4, 275-282
- 5 - AUBEL E., SZULMAJSTER J.-
Contribution à l'étude de la fermentation et de la respiration d'Esch.coli
Bioch. Bioph.Acta 1950, 5, 503 et 517
- 6 - BAUCH R.-
Sulfonamide und Colchicin, ein botanischer Beitrag zum Sulfonamidproblem.
Pharmazie Dtsch. 1949, 4, 1-7
- 7 - BAYLEY J.- (cité par WINTERSTEINER O.)
Ann.Rew.of Biochem.1949, 18, 585
- 8 - BENIGNO P.-
Ricerche quantitative sull'azione antibatterica di sulfamidici mercurati
Arch. Intern.Pharmacodyn. 1948, 77, 5-16
- 9 - BIGGER J.-
Synergism and antagonism as displayed by certain antibacterial substances
Lancet 1950, 8, 46-50
- 10- BONTEMPS R.-
Séparation et dosage du sulfate d'orthoxyquinoléine et de la sulfanilamide
J.Pharm.Belgique 1952, 7, 553-556
- 11 -BOXER G.E., OTT W.H., SHONK C.E.-
Influence of vitamin B₁₂ on the coenzyme A content of the liver of chicks
Arch.Biochem.Bioph.1953, 47, 474-475
- 12 - BRATTON A.C., MARSHALL E.K.-
A new coupling component for sulfanilamide determination
J.Biol.Chem.1939, 128, 537-550

- 13 - BUTLER T.C., DICKISON H.L., GOVIER W.-
The effects of sulfanilamide and some of its derivatives on the reaction of mice to anesthetics
J.Pharm. exp. Ther.1941, 72, 298-305
- 14 - BYRNE P.J., ALBERTS A.A., CHRISTIAN J.E.-
The synthetis of certains sulfur 35- labeled sulfadru~~gs~~
J.Am.Pharm.Assoc.1953, 42, 77-79
- 15 - CHANTRENNE H.-
The requirement of coenzyme A in the enzymatic synthetis of hippuric acid.
J.Biol.Chem.1951, 189, 227
- 16 - CHODAT.- Les ébauches de l'adaptation. L'adaptation enzymatique
Arch.des Sciences 1950, 3, 395-418
- 17 - COHEN P.P., MacGILVERY R.W.-
Peptide bond Synthetis. I. The formation of p-aminobenzoïc acid by rat liver sclices
J.Biol.Chem.1946, 166, 261-271
- 18 - DALLEMAGNE J., DEROUAUX G.-
Influence du radical pseudobutyle sur le pouvoir bactéricide du phénol et de ses dérivés
Arch.Intern.Pharmacodyn.1946-47, 73, 147-158
- 19 - DELVAUX E.- Les Versènes
J.Pharm.Belg.1952, 505-510
- 20 - DEMEREC M.-
Production of Staphylococcus strains resistant to various concentrations of penicillin
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1945, 31, 16-24 cf J. Bact.1948, 56, 63
- 21 - DENIGES G.-
Dosage cyanoargentimétrique du mercure
Précis de Chimie analytique 832-834 Maloine ed.Paris, 1930
- 22 - DOLIQUE R., MAS P.-
Propriétés physicochimiques des sulfamides.IV: Etude des dérivés mercuriels des sulfamides
Trav.Soc.Pharmac.Montpellier 1953, 13, 87-91
- 23 - DUREL P., RATNER V.-
Contribution à l'étude de la potentialisation toxique sulfapyridine-papavérine (phénomène de Glaubach).
C.R.Soc.Biol.1943, 137, 214-215

- 24 - FEENEY R.E.
The Antagonistic Activities of Conalbumin and
8-Hydroxyquinoline (oxine)
Arch.Biochem.Bioph.1951, 34, 196-208
- 25 - FLEISCH A., NICOD F., REYMOND C.-
Influence des sulfamidés sur la respiration
cellulaire
Helv. physiol.pharmacol.Acta 1943, 1, 275-286
- 26 - GALE E.F., PAINE T.F.
Bioch.J.1950, 48, 298
- 27 - GLAUBACH S.-
Sulfapyridine Potentiation of Narcotic and To-
xic Effects of Papaverine in Rats and Rabbits
Proc.Soc.exp.Biol.a Med.1939- 42, 325-327
- 28 - GLAUBACH S.-
Enhancement of certain Toxic Effects of Codeine
and Morphine by Sulfapyridine
Proc.Soc.exp.Biol.a Med.1941, 46, 53-57
- 29 - GOTS J.S., SEVAG M.G.
Antagonism to sulfathiazole by methylene blue
and riboflavin in pneumococcal respiration
J.Bact.1949, 58, 585-593
- 30 - HADOT J.J.- (voir aussi 43, KAYSER F. et HADOT J.J.)
Modifications apportées à l'action antibioti-
que des Sulfamides par leur Association avec
divers composés chimiques.
Thèse Pharmacie, Nancy, 1951
- 31 - HAHN F., RUMMEL W., VORMANN R.-
Ueber die Ursache der erhöhten Giftigkeit von
Sulfonamid-alkaloid-kombinationen
Arch.Intern.Pharmacod.1951, 87, 147-158
- 32 - HANDOVSKY H.-
The problem of specific resistance of micro-
organisms to chemotherapeutic substances
Acta pharm.tox.Danemark 1950, 6, 293-298
- 33 - HEIN H.-
Rutin und die bakteriostatische Wirkung der
Sulfonamide
Aerztl.Forsch.1950, 4, 69-71
- 34 - HENRY R.J.
The mode of Action of Sulfonamides
J.Macy ed. U.S.A.1944

- 35 - HINSHELWOOD C.-
The chemical kinetics of the bacterial cell.
Livres Oxford 1946 et Endeavour 1949, 32, 151-156
- 36 - HINSHELWOOD C.-
Chemistry and Bacteria
Nature 1950, 166, 1089-1092
- 37 - HOFFMANN-OSTENHOF O., GRATZL K.-
Zur Wirkungsweise der Sulfonamide und Antibiotica
Klin.Med.Oesterr.1947, 19, 903-918.
- 38 - IVANOVICS G.-
Das Salicylation als spezifischer Hemmungsstoff der Biosynthese der Pantothenensäure
Z.physiol.Chem.1942, 276, 33
- 39 - JAMES G.V.
Biochem J. 1939, 33, 1688
cité par STEKOL J.A. Ann. Rev. of Bioch. 1941, 10, 274
- 40 - JOHNSON W.J., QUASTEL J.H.-
A comparison of the effects of narcotics and of 2-4-dinitrophenol on sulfanilamide acetylation
J.Biol.Chem.1953, 205, 163-171
- 41 - KAPLAN N.O., LIPMANN F.
The essay and distribution of coenzyme A
J.Biol.Chem.1948, 174, 37-44
- 42 - KAYSER F., BESSON S.-
Action de sulfamides et de la colchicine sur le développement de la racine de Pisum
C.R.Soc.Biol.1948, CXLII, 84-86
- 43 - KAYSER F., HADOT J.J.-
Effets de l'association de divers composés chimiques sur l'action antibiotique des sulfamides
Bull. Soc; Chim. Biol.1951, 33, 1591-1599
- 44 - KIELLEY R.K., SCHNEIDER W.C.-
Synthesis of p-Aminohippuric acid by mitochondria of mouse liver homogenates
J.Biol.Chem.1950, 185, 869-880
- 45 - KLEIN H.P.-
Relation of Coenzyme A to steroid and total lipid synthesis in yeast
Fed.Proc.1951, 10, 209

- 46 - KLEIN J.R., HARRIS J.S.-
The acetylation of sulfanilamide in vitro
J.Biol.Chem.1938, 124, 613-626
- 47 - KLEINSORG H., LOESER A.-
Ueber die Beinflussung von Arzneimittelwirkungen durch Sulfonamide
Schw.Med.Woch,1950, 2, 231-234
- 48 - KOSTENBAUDER H.P., GABLE F.B., MARTIN A.N.-
A buffer system for ophthalmic solutions of sodium sulfonamides
J.Am.Pharm.Assoc.1953, 42, 210-213
- 49 - LAMPEN J.O., JONES M.J., ROEPKE R.R.-
Mutant strains of Escherichia coli unable to synthesize p-aminobenzoic acid
J.Biol.Chem.1949, 180, 423-434
- 50 - LANDY M., LARKUM N.W., OSTWALD E.J., STREIGHTOFF F.-
Increased synthesis of PAB associated with the development of sulfonamide resistance in St.aureus
Science 1943, 97, 265-267
- 51 - LASSEUR Ph., DUPAIX A., OLIVIER M.
Phénomène de Charrin et Roger
Trav.Lab.Microbiol.Faculté Pharmacie Nancy
1931, 4, 139-210
- 52 - LEMBERG R., GALLAGHAN J.P., TANDY D.E.
Austr.J.exp.Biol.1948, 26, 9
(cité par 62)
- 53 - LIPMANN F.-
Acetylation of sulfanilamide by liver homogenates and extracts
J.Biol.Chem.1945, 160, 173-190
- 54 - LIPMANN F., KAPLAN N., NOVELLI D., TUTTLE C., GUIRARD B.
Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivative
J.Biol.Chem.1947, 167, 870-871
A common Factor in the enzymatic acetylation of sulfanilamide and of choline, *idem, ibidem*,
1946, 162, 743
- 55 - LYNEN F.-
Mécanisme de la β -oxydation des acides gras
Bull.Soc.Chim.biol.1953, 35, 1064-1083

- 56 - MAAS W.K.-
Pantothenate studies.II: Evidence from mutants
for interference by Salicylate with Pantoate
Synthesis
J.Bact.1952, 63,227-232
- 57 - MAGNE H.,MAYER A.,PLANTEFOL L.-
Action pharmacodynamique des phénols nitrés.
Un agent augmentant les oxydations cellulaires
Le dinitrophénol 1-2-4 (Thermol)
Ann.Physiol. et Physicoch.biol.1931,7,269-273
- 58 - MAKEES S.,DEMOLE V.-
p-Aminobenzoësäure als Entgiftungssubstanz.
Helv.physiol.Pharmac.Acta 1943, 1, 241-247
- 59 - MARCHAL J.G., GIRARD Th.-
Etude du pouvoir réducteur de quelques souches
de colibacille sur le molybdate d'ammonium
Trav. Lab. Microb. Fac.Pharm.Nancy,1948-1949,
16, 11-23
- 60 - MARINI-BETTOLO G.B.,BORZINI G.
Contributi alla conoscenza del meccanismo dell'
azione fungistatica. I:Azione biologica di sos-
tanze coloranti chinoidi costituenti sistemi
reversibili di ossidoreduzione
Ist.bot.Univ.Lab.Crittogam.Pavia,Atti,ser.5,
3, 261-264
- 61 - MARSHALL J.,CUTTING W,EMERSON J.-
J.A.M.A.1938,110, 252
in Ann.Rew.of Bioch.1941,p.274
- 62 - MOOS F., LEMBERG R.-
The production of p-aminobenzoic acid by Staphy-
lococcus aureus,made resistant to sulphonamides
Austr.J.Exp.Biol.a Med.Science 1950,p.67-76
- 63 - MORVILLO V., GARATTINI S.-
Confroto l'azione antisulfanilamidica del l'a-
cido paraminohippurico
Boll.Soc.Ital.Biol.sper.1952, 28, 393-395
- 64 - MOUNEYRAT A.-
p-Aminobenzène sulfonamide salts
Brevet français N°849.504,in Chem.Abst.1941,
35, 6979
- 65 - NASSI L.-
Sull'azione antibiotica in vitro,disostanze
naphtochinoniche e della vitamine K sintica,
idrosolubile,verso lo staphilococco,il bacillo
difterico,e il bacillo del tifo
Boll.Soc.Ital.sper.1946,22,141-144

- 66 - NASSI L.-
Sull'attivita, in vitro, di alcuni chinoni
(chinidrone, benzochinone) di fronte allo sta-
filocco e al bacillo del tifo.
Boll.Soc.Ital. Biol. sper. 1946, 22, 139-141
- 67 - NEUMANN J.-
Sur l'inhibition de la croissance d'*Aspergil-
lus niger* provoquée par le pyrocatéchol et
par la p-quinone; similitude de l'antagonisme
exercé par l'acide para-amino-benzoïque et par
la para-amino-phénylsulfamide sur cette inhibi-
tion.
Schweiz. Ztsch.Path.Bakt.1946, 9, 419 et 426.
- 68 - NOVELLI G.D., SCHMETZ F.J., KAPLAN N.-
Enzymatic degradation and resynthetic of coen-
zyme A
J.Biol.Chem.1954, 206, 533-545
- 69 - OAKBERG E., LURIA S.-
Mutations to sulfonamide resistance in staphy-
lococcus aureus
Genetics 1947, 32, 249-260.
- 70 - OCHOA S., STERN J.R., SCHNEIDER M.C.-
Enzymatic synthetis of citric acid
J.Biol. Chem. 1951, 193, 691-701
- 71 - OELKERS H.A., WANOWIUS E.-
Giftigkeitssteigerung von Arzneimitteln durch
Sulfonamide
Klin. Woch.1942, p.752-753.
- 72 - PERAULT R., PONNET-MAURY P., ERISCHEN L.-
C.R.Soc.Biol. 1943, 137, 598
- 73 - POPP E.M., TROTTER J.R.-
Studies on the relationship between folic acid
and coenzyme A
J.Biol. Chem. 1952, 199, 547-552.
- 74 - POUCHOL J.-
Effet de l'association d'un Sulfamide et
d'un Phénol sur la croissance d'une bactérie
(*E.coli*)
Thèse Pharmacie, Nancy, 1950.
- 75 - POUTEAU-THOUVENOT M.-
Action de la Sulfanilamide et de l'Association
Sulfamide-Phénol sur quelques processus métabo-
liques d'*Escherichia coli*.
Thèse Pharmacie, Nancy, 1951.

- 76 - RIGGS T.R., CHRISTENSEN H.N.-
Metabolic conjugations of p-aminobenzoic acid
in the rat
J.Biol.Chem.1951, 193, 675-681
- 77 - RODIGHIERO G.-
Derivati mercurati della solfanilamide
Ann.Chim.appl.Ital.1949, 39, 27-32
- 78 - ROTH W., SORKIN E., ERLIENMEYER H.-
Über die Wirkung des Oxins in Gegenwart von
Metallionen auf Kulturen von Tuberkelbazillen
und Staphylokokken
Schweiz. Path. Bakt. 1952, 15, 300-307
- 79 - RUBBO S., ALBERT A., GIBSON M.-
The influence of chemical constitution on an-
tibacterial action of 8-hydroxyquinoline(oxi-
ne)
Brit. J.exp.Path.1950, 31, 425-441
- 80 - SCHMIDT L.H., SESLER C.L., DETTWILER H.A.-
Studies on sulfonamide resistant organisms.
Ia:Development of sulfapyridine resistance
by pneumococci.
J.Pharmac. 1952, 74, 175-189
- 81 - SCHNITKER N.A.-
Sulfonamid compounds in treatment of infections
New-York 1942 - cité par MARTIN G.J., RENNEBAUM
E.H.- J.Biol.Chem.1943, 151, 417
- 82 - SLONIMSKI P.-
La formation des enzymes respiratoires chez
la levure
Actualités biochimiques 1953, Masson,éd.Paris
- 83 - STADTMAN E.R., NOVELLI D., LIPMANN F.-
Coenzyme A a function in and acetyl transfer
by the phosphotransacetylase system
J.Biol.Chem.1951, 191, 365-376
- 84 - TAILLANTER P.-
Principe de renforcement de l'action des sul-
famides par les colorants vitaux
Thèse médecine, Paris, 1943.
- 85 - TREFOUEL J.-
Résistance aux médicaments
Journées thérapeutiques de Paris 1951,
p.13 - 22, DOIN, éditeur, Paris

- 86 - UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F.-
Manometric Techniques et Tissue Metabolism
Burgess U.S.1949
- 87 - VECCHIO G.del, VECCHIO V.del, CARRATU C., NAPOLI A.,
ARZENZINO H.-
Sull'azione antibiotica dei chinoni XI
Bull.Soc.Ital.Biol.sper.1948, 24, 1171-1173
& 1286-1291
in CNRS.Bull.analyt.11-107.367
- 88 - VELLUZ.-
Substances naturelles de synthèse
1951, 1, 110, Masson éd. Paris, 1951.
- 89 - VORMANN R., HAHN F., RUMMEL W.-
Untersuchungen am Gewebsstoffwechsel zur Frage
der Giftigkeitssteigerung von Pharma a durch
Sulfonamide
Arch.intern.Pharmacodyn.1950, 212, 103-105
- 90 - WARE G.C.-
Potentiation of the antibacterial activity of
sulfathiazol by glutamine
Lancet 1951, 2, 865-866
in Exerpta med.1952, p.991
- 91 - WENK M.-
Rediron a new diuretic
Die Medizinische 1953, p.1054-1056
in Chem.Abst.1953, 12627.
- 92 - WOJAHN H.-
Zur Kenntnis Schwermetallverbindungen in der
Sulfonamidreihe
Pharmazie Dtsch.1948, 3, 254-255.
- 93 - WOOD W.B., AUSTRIAN R.-
J.exptl.Med.1942, 75, 383
cité par ROBLIN R.O.Chem.Rew.1946, 38, 274
- 94 - WRIGHT, WELSCH.-
Science 1943, 97, 426

- 95 - YACOWITZ H., NORRIS L.C., HEUSER G.F.-
Evidence for an interrelation between vitamin B₁₂ and pantothenic acid
J.Biol.Chem.1951, 192, 141-146
- 96 - ZALOKAR M.-
The p-aminobenzoic acid requirement of the sulfonamid-requiring mutant strain of N.
Proc.Nat.Acad.Sc.USA.1948, 33, 32-36
in CNRS. Bull.anal. 9-132.568
- 97 - ZWART A.G.-
A modified method for the calibration of Warburg flasks and manometers
Bioch.Bioph.Acta 1952, 9, 104.

- TABLE DES MATIERES -

Pages:

<u>AVANT PROPOS</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	2
 <u>CHAPITRE I.</u> 	
GENERALITES SUR LES TECHNIQUES SUIVIES DANS NOS RECHERCHES:	
A) Microorganisme et Milieu de Culture Utilisés	5
B) Ensemencement	6
C) Matériel et Mesure du Développement Bactérien	7
D) Sulfamides employées. Solutions	8
E) Technique d'un essai réalisé in vitro	9
F) Technique d'un essai fait in vivo	10
G) Techniques des expériences faites avec l'appareil manométrique de Warburg.	11
 <u>CHAPITRE II.</u> 	
PREPARATION ET PHARMACOLOGIE D'UN DERIVE MERCURIEL DE LA SULFANILAMIDE	
A) Préparation des Dérivés mercuriels des Sulfamides	14
B) Propriétés physiques et Chimiques du Sulfamidate de Mercure préparé par nous	17
C) Propriétés pharmacologiques	18
 <u>CHAPITRE III.</u> 	
ETUDES D'ASSOCIATIONS A BASE DE SULFAMIDES	
A) Associations avec les agents susceptibles de former des systèmes oxydo-réducteurs	24
B) Analyse des modalités de la synergie salicylate-sulfamides	43
C) Effets de l'association des sulfamides avec différents inhibiteurs d'enzymes et antiseptiques	63
D) Association du sulfathiazol avec des corps susceptibles de présenter des propriétés antisulfamides.	81
 <u>CHAPITRE IV.</u> 	
ESSAI D'INTERPRETATION DE LA SULFAMIDORESISTANCE	
A) Etude de l'action bactériostatique de l'acétylsulfanilamide in vitro	99
B) Etude de l'action du pantothénol associé à la sulfanilamide sur la croissance de Esch.coli.	102
C) Dosages comparatifs de coenzyme A chez Esch.normal et rendu sulfamidorésistant.	106
<u>CONCLUSION</u>	121

Vu :

NANCY, le 7 Avril 1954.

Le Président de Thèse,

F. KAYSER.

Vu et approuvé:

NANCY, le 8 Avril 1954.

Le Doyen de la Faculté de
Pharmacie:

G. RICHARD.

Vu et permis d'Imprimer:

NANCY, le 9 Avril 1954,

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université:

J. CAPELLE.

